ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Замятина Евгения Владимировна

КЛИНИКО-ИММУНОЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И КРИТЕРИИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ ОСТРОГО КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

14.01.09 –инфекционные болезни

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Екатерина Николаевна Ильинских

Томск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ. 5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 17
1.1 Использование математических моделей и алгоритмов для прогноза тяжести течения инфекционных заболеваний 17
1.2 Характеристика клинико-эпидемиологических и лабораторных прогностических критериев риска тяжелого течения клещевого энцефалита . 19
1.3 Характеристика иммунного ответа и цитокинового статуса при различных клинических формах клещевого энцефалита 23
1.4 Характеристика цитогенетических нарушений, индуцированных вирусами, и их связь с окислительным стрессом 26
1.5 Роль полиморфизма некоторых генов как один из факторов риска клинически более тяжелых форм клещевого энцефалита и других инфекций 32
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 36
2.1 Общая характеристика обследованных групп пациентов и объем проводимых исследований 36
2.2 Методы исследования 42
2.2.1 Получение культур мононуклеарных клеток периферической крови . . . 42
2.2.2 Цитогенетический анализ бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов в культурах мононуклеарных клеток периферической крови . 42
2.2.3 Определение спонтанной продукции цитокинов в супернатантах культур мононуклеарных клеток периферической крови 44
2.2.4 Определение малонового диальдегида в сыворотке крови 44
2.2.5 Цитогенетический анализ клеток буккального эпителия 44
2.2.6 Анализ полиморфизма генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1*. 45
2.2.7 Статистические методы 46
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 49
3.1 Клинико-лабораторные прогностические критерии очаговой формы острого клещевого энцефалита 49

3.1.1 Эпидемиологические и анамнестические предикторы очаговой формы клещевого энцефалита 49
3.1.2 Клинические предикторы очаговой формы клещевого энцефалита. 52
3.1.3 Модели прогноза очаговой и менингеальной форм клещевого энцефалита для формирования групп риска, разработанные на основе анализа клинико-эпидемиологических данных 57
3.1.4 Общеклинические лабораторные предикторы очаговой формы клещевого энцефалита. 64
3.2 Иммунологические и цитогенетические прогностические критерии очаговой формы острого клещевого энцефалита 74
3.2.1 Показатели цитокинового статуса в культурах мононуклеарных клеток, имеющие прогностическое значение для очаговой формы клещевого энцефалита 74
3.2.2 Уровень цитогенетических нарушений и показатель концентрации малонового диальдегида, имеющие прогностическое значение для очаговой формы клещевого энцефалита 79
3.2.3 Модель прогноза очаговой и менингеальной форм клещевого энцефалита для формирования групп риска, разработанные на основе анализа данных иммунологических и цитогенетических тестов 85
3.2.4 Характеристика практического применения моделей прогноза очаговой или менингеальной форм клещевого энцефалита для формирования групп повышенного риска 89
3.2.5 Цитогенетические последствия у больных клещевым энцефалитом в зависимости от вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* в генотипе 91
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 96
4.1 Эпидемиологические и анамнестические предикторы клинических форм клещевого энцефалита 96
4.2 Клинические предикторы менингеальной и очаговых форм клещевого

энцефалита 98
4.3 Общеклинические лабораторные предикторы клинических форм клещевого энцефалита 100
4.4 Иммунологические прогностические критерии клинических форм клещевого энцефалита 104
4.5 Характеристика цитогенетических нарушений и показателей окислительного стресса у больных клещевым энцефалитом. 107
4.6 Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1*. 111
4.7 Математические модели и формулы для формирования групп риска очаговой формы клещевого энцефалита и прогноза тяжести течения заболевания. 114
ВЫВОДЫ. 119
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. 121
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ. 123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. 125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Клещевой энцефалит (КЭ) является одной из наиболее распространенных природно-очаговых инфекций в Сибири и, в особенности, в Томской области [72]. Известно, что острый КЭ может протекать как относительно благоприятно в виде лихорадочной формы (ЛФ), так и вызывать более тяжелую клиническую картину, к которой относят менингеальную (МФ) и очаговую (ОФ) формы этой инфекции [16, 87]. Клиническая форма заболевания с очаговой симптоматикой характеризуется поражением центральной нервной системы (ЦНС) с высоким риском инвалидизации и летального исхода. Установлено, что тяжесть течения КЭ варьирует в различных географических регионах и во многом зависит от генотипа вируса [3, 37, 87]. Одной из проблем диагностики КЭ является раннее распознавание ОФ, которую сложно прогнозировать в начале заболевания и отличить от тяжелой МФ [16, 87]. Выявление наиболее информативных прогностических критериев ОФ КЭ в начальном периоде заболевания потенциально может быть использовано для формирования групп повышенного риска тяжелого течения КЭ и способствовать совершенствованию диагностики этой инфекции.

К современным направлениям диагностики инфекционных заболеваний относится разработка математических моделей, диагностических алгоритмов и классификаторов, которые используются практическими врачами для формирования групп риска тяжелых форм и/или исходов таких болезней, как лихорадка денге и иксодовый клещевой боррелиоз в частности [23, 160, 165]. Большинство современных авторов для построения математических моделей и диагностических алгоритмов инфекционных заболеваний используют бинарную логистическую регрессию и ROC-анализ рутинных данных эпидемиологического анамнеза, клинических и лабораторных показателей. Другие исследователи опираются на результаты оценки цитокинового и иммунного статусов пациентов [23, 160, 165].

В результате изучения цитокинового и иммунного статусов у больных КЭ большинством авторов установлено, что иммунный ответ в случае МФ болезни характеризуется поляризацией в сторону Т-хелперов (Th) типа 1 [20, 28, 33, 53]. В случае развития ОФ КЭ, в особенности в случае летального исхода, у больных повышается продукция некоторых провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (ФНО)-α, нарастают признаки дефицита Т-клеточного иммунного ответа, что свидетельствует о нарушении противовирусной защиты [28, 53, 58].

Показано, что многие вирусные инфекционные заболевания, включая КЭ, сопровождаются индукцией повреждений ДНК и цитогенетическими нарушениями в различных типах клеток [158]. Одним из основных механизмов, приводящим к интенсификации мутационных изменений ДНК при инфекционном процессе считается окислительный стресс, инициируемый провоспалительными цитокинами, включая ФНО-α [18, 77, 115, 126, 129, 138, 152]. В настоящее время активно изучается роль реактивных форм кислорода и инициируемого ими процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также повреждения макромолекул, включая ДНК, в патогенезе инфекционных, онкологических и воспалительных заболеваний [1, 39, 135, 163]. Вместе с тем, влияние этих факторов на патогенез и клиническую картину КЭ остается малоизученным.

К факторам, от которых зависит тяжесть клинического течения некоторых инфекционных заболеваний, включая КЭ, относят присутствие в генотипе больного определенных типов мутаций в таких генах как, например, ген Толл-подобного рецептора 3 (*TLR3*) [79, 133, 177]. В настоящее время показано, что клиническая форма КЭ и вовлечение в процесс ЦНС зависят от экспрессии медиаторов воспалительного ответа, которые, в свою очередь, ассоциированы с генетической предрасположенностью макроорганизма [83, 172].

Таким образом, оценка у больных различными клиническими формами КЭ эпидемиологических, клинических, лабораторных параметров, а также результатов иммунологических и цитогенетических тестов, с использованием современных методик статистического анализа, потенциально может позволить

выделить наиболее значимые прогностические критерии тяжелых форм и создать на этой основе математические модели с целью формирования на раннем этапе болезни групп пациентов с повышенным риском очаговой и менингеальной форм этой инфекции.

Степень разработанности темы диссертации

За последние 10 лет в литературе, посвященной КЭ, большинство авторов в основном только описывали факторы риска, показатели и симптомы, характерные для течения той или иной клинической формы КЭ [7, 14, 22, 26]. Однако, тема идентификации наиболее информативных предикторов с определением весовых коэффициентов доказательности для каждого параметра и создания на этой основе математических моделей с использованием современных методик статистического анализа и компьютерных программ для помощи практическим врачам в оценке тяжести течения, раннего прогнозирования клинических форм и риска неблагоприятного исхода в ранние сроки заболевания КЭ, в настоящее время разработана весьма слабо и явно недостаточно [7, 11, 50, 58, 156]. В частности, P. Bogovic с соавт. [87, 151] предложен алгоритм количественной оценки степени тяжести заболевания у больных МФ и ОФ КЭ с использованием стандартизированной анкеты-опросника, а в исследовании В. В. Проворовой [50] разработаны две модели раннего прогноза ОФ КЭ на основе клинико-эпидемиологических данных с использованием многофакторного дискриминантного анализа. Однако главными недостатками этих моделей клинической диагностики КЭ являются трудность их использования на практике, поскольку большинство из них требуют сложных подсчетов и компьютерных программ. Недостатком также является отсутствие данных об оценке прогностической ценности таких моделей и формул.

В течение последних 20 лет несколькими авторами изучены показатели цитокинового и иммунного статусов у больных различными клиническими формами КЭ [20, 28, 33, 53]. Полученные результаты в основном позволяют интерпретировать роль дисбаланса ответов Th1 и Th2-типов в патогенезе этой

инфекции. Однако данные этих авторов часто неоднозначны и противоречивы. В работах лишь одного автора предложена прогностическая формула ранней диагностики ЛФ и МФ КЭ на основе определения концентрации некоторых цитокинов в сыворотке крови, нейроспецифической енолазы в ликворе, а также показателей общеклинического анализа крови [11, 42].

В нескольких исследованиях по КЭ у больных доказана активация окислительного стресса, повышение продукции реактивных форм кислорода и азота на фоне значительного угнетения антиоксидантной системы [31, 44, 135, 180]. При этом тяжесть течения КЭ и развитие наиболее тяжелой ОФ болезни также, по-видимому, тесно связаны с активностью иммунопатологических и окислительных процессов [44]. Кроме того, в настоящее время показано, что многие РНК-содержащие вирусы способны как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* вызывать повреждение ДНК [126, 158] что, прежде всего, обусловлено повышенной активацией окислительного стресса [143, 182]. Установлено, что вирус КЭ также вызывает повреждение ДНК и хромосомные аберрации [17, 54]. Однако взаимосвязь между показателями активности окислительного стресса, продукцией провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и уровнем цитогенетической нестабильности у больных КЭ в настоящее время остается не изученной.

На примере некоторых инфекционных заболеваний, таких как туберкулез, малярия, ВИЧ-инфекция и геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, показано, что полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1*, связанный с их делецией, приводящей к нарушению синтеза одного из важнейших ферментов антиоксидантной защиты, играет важную роль в повышенном риске тяжелого течения этих болезней [51, 59, 107, 119]. Во многих исследованиях, доказана связь между носительством делеций генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и/или *GSTT1* и значительным повышением активности окислительного стресса и уровня клеток с повреждениями ДНК и цитогенетическими нарушениями [114, 125, 144]. Тем не менее, роль

полиморфизма этих генов в индукции цитогенетических нарушений у больных КЭ не изучена.

Цель исследования

Выявить наиболее информативные клинико-эпидемиологические, иммунологические и цитогенетические критерии прогнозирования риска тяжелых клинических форм острого клещевого энцефалита в ранние сроки заболевания.

Задачи исследования:

1. Определить среди клинико-эпидемиологических и лабораторных параметоров наиболее информативные прогностические критерии очаговой формы острого клещевого энцефалита в раннем периоде заболевания (от момента начала лихорадки до появления очаговых симптомов).

2. Идентифицировать наиболее значимые показатели цитокинового статуса, окислительного стресса и цитогенетической нестабильности как предикторов повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита в ранние сроки заболевания.

3. Выявить взаимосвязь между активностью окислительного стресса, показателями цитокинового статуса и цитогенетической нестабильностью у больных острым клещевым энцефалитом.

4. Изучить влияние носительства функционирующих или нефункционирующих вариантов генов глутатион-S-трансфераз (одной из наиболее важных групп ферментов системы антиоксидантной защиты) в генотипе больных острым клещевым энцефалитом на уровень цитогенетической нестабильности.

5. Разработать на основе анализа клинико-эпидемиологических данных, а также показателей цитокинового и цитогенетического статусов, математические модели с целью формирования групп повышенного риска очаговой и менингеальной форм острого клещевого энцефалита в начальном периоде заболевания.

Научная новизна

Впервые с применением пошагового бинарного логистического регрессионного анализа и ROC-анализа идентифицированы основные клинико-эпидемиологические, иммунологические и цитогенетические прогностические критерии повышенного риска ОФ КЭ, на основе которых разработаны математические модели прогноза МФ и ОФ острого КЭ в раннем периоде болезни. В отличие от исследований большинства других авторов, для каждого идентифицированного нами критерия и для всех построенных моделей определены весовые коэффициенты доказательности и прогностической силы каждого параметра, что позволило исключить все несущественные и избыточные переменные.

Кроме того, впервые выявлены наиболее значимые предикторы повышенного риска ОФ КЭ на основе оценки уровня цитогенетической нестабильности, активности окислительного стресса, а также продукции цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови больных этой инфекцией. В результате исследования впервые доказано, что к значимым предикторам ОФ КЭ относятся значения показателя активности окислительного стресса − малонового диальдегида (МДА), критерии цитогенетической нестабильности, включающие частоту клеток буккального эпителия с микроядрами (МЯ) и частоту Т-лимфоцитов с МЯ в культуре клеток периферической крови, а также изменения таких параметров цитокинового статуса как продукция ИФ-α, ИФ-γ, интерлейкина (ИЛ)-10, ФНО-α и соотношение концентрации ФНО-α к концентрации ИЛ-4. У больных КЭ впервые выявлена прямая взаимозависимость между концентрацией МДА, секрецией ФНО-α и уровнями клеток с цитогенетическими нарушениями.

На примере ЛФ КЭ впервые установлена связь между повышением уровня клеток с цитогенетическими нарушениями и присутствием в генотипе больного нефункционирующих вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1*(0/0) и/или *GSTT1*(0/0), одной из наиболее важных групп ферментов системы антиоксидантной защиты.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате настоящего исследования получены принципиально новые данные теоретического характера, касающиеся прямой взаимозависимости между такими показателями активности окислительного стресса, эндогенной интоксикации, продукции провоспалительных цитокинов и/или хромосомными аберрациями, как концентрация МДА в сыворотке крови, секреция ФНО-α и уровни эпителиальных клеток и/или лимфоцитов крови с МЯ (маркеров повреждения ДНК в клетках) у больных КЭ. Это позволяет рассматривать активацию окислительного стресса как один из важных механизмов повышения уровня цитогенетической нестабильности при этой инфекции. Получены знания фундаментального характера, свидетельствующие о том, что частота клеток с цитогенетическими нарушениями у больных ЛФ КЭ зависит от присутствия в генотипе больного нефункционирующих генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1*(0/0) и *GSTT1*(0/0), одной из наиболее важных групп ферментов системы антиоксидантной защиты. Кроме того, для оценки тяжести течения КЭ, впервые показана эффективность применения простого, но одновременно надежного цитогенетического метода анализа частоты буккальных эпителиальных клеток с МЯ, которые считают биомаркерами геномной нестабильности и мутагенного воздействия эндогенных и экзогенных факторов.

Полученные в результате настоящего исследования данные значительно расширяют представления о возможностях прогнозирования ОФ КЭ на раннем этапе заболевания. Идентифицированы наиболее значимые клинико-эпидемиологические, иммунологические и цитогенетические прогностические критерии и построены три взаимозаменяемые математические модели с применением бинарной логистической регрессии и ROC-анализа, позволяющие формировать группы риска ОФ и МФ КЭ в начальном периоде заболевания. Все модели показали отличное качество прогностических возможностей, их можно легко использовать на практике, поскольку каждая из них не требует сложных подсчетов.

Результаты настоящей исследовательской работы могут быть использованы в учебно-методическом процессе для студентов медицинских вузов, обучающихся по специальностям «Лечебное дело» и «Педиатрия», на сертификационных циклах переподготовки и повышения квалификации врачей-инфекционистов, а также являются полезным дополнительным инструментом, который может быть использован практическим врачом для формирования групп повышенного риска менингеальной и очаговой форм КЭ в начальном периоде заболевания.

Методология и методы диссертационного исследования

Работа основана на использовании общенаучной методологии, включающей формально-логические и специфические методы. Исследование выполнено в дизайне рандомизированного выборочного клинического исследования типа «случай-контроль». Отбор единиц наблюдения для исследования осуществлялся выборочным методом с использованием двух подходов: 1) проспективного, в результате обследования больных – участников исследования, имевших различные клинические формы КЭ, с использованием не только общеклинических, но и иммунологических и цитогенетических методов; 2) ретроспективного, в результате отбора и анализа эпидемиологических, анамнестических, клинических и лабораторных данных из архивных историй болезни больных с диагнозом КЭ. Работа выполнена с использованием клинико-эпидемиологических, лабораторных, биохимических, иммунологических, цитогенетических, молекулярно-генетических и статистических методов. Применены методы описательной, сравнительной и аналитической статистики, включая бинарную логистическую регрессию и ROC-анализ. Для создания математических моделей и диагностических алгоритмов количественной оценки прогноза различных клинических форм КЭ использовались специализированные модули программы STATISTICA 12.0 (StatSoft, США). Кроме того, применялась программа Epi Info, версия 3.3.2 (Центр контроля и профилактики заболеваний, США).

Положения, выносимые на защиту:

1. Использование наиболее информативных клинико-эпидемиологических и лабораторных показателей в качестве ранних предикторов очаговой формы клещевого энцефалита, а именно: возраста больного, локализации присасывания клеща, наличия фоновых заболеваний, показателей пульса, частоты дыхания, артериального давления, данных общего анализа крови, а также выявление хотя бы одного из таких признаков, как оглушенность, дезориентация, появление спутанной речи, рвоты, грубой ригидности затылочных мышц, симптомов Кернига и Брудзинского − позволит сформировать группу повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита и улучшить диагностику этой инфекции.

2. Повышение концентрации малонового диальдегида, фактора некроза опухоли-α и соотношение концентраций фактора некроза опухоли-α и интерлейкина-4, а также увеличение частоты встречаемости клеток с микроядрами, являются наиболее информативными иммуноцитологическими прогностическими критериями повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита в первые дни болезни.

3. Уровень клеток с цитогенетическими нарушениями у больных клещевым энцефалитом находится в прямой корреляционной зависимости от активности образования продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида, секреции провоспалительного цитокина – фактора некроза опухоли-α, а также от присутствия в генотипе больного нефункционирующих вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1*(0/0) и/или *GSTT1*(0/0), одной из наиболее важных групп ферментов системы антиоксидантной защиты.

Степень достоверности

Высокая степень достоверности данных, полученных в результате выполнения настоящей работы, обеспечена достаточным объемом групп участников исследования, использованием современных иммунологических, биохимических, цитогенетических, молекулярно-генетических и статистических

методов, а также применением для обработки материала специализированных статистических компьютерных программ.

Легитимность исследования подтверждена решением Этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протоколы № 4308 от 19.10.2015 г. и № 993 от 27.04.2009 г.) и соблюдением этических принципов, изложенных в Хельсинской декларации.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности: 14.01.09 – «Инфекционные болезни» по областям исследований:

п. 1 – изучение взаимодействия возбудителей с организмом человека, а также иммунологических, патоморфологических, биохимических и патофизиологических изменений в организме в процессе болезни;

п. 2 – исследование клинических проявлений инфекционного процесса, повреждения и нарушения функции различных органов и систем, особенности течения заболевания, а также прогнозирование течения инфекционного заболевания и его исходов;

п. 3 – диагностика инфекционных болезней и дифференциальная диагностика с использованием различных методов.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: 7-м Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2015), 15-м Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015), 8-м Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2016), 9-м Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2017), 2-м Международном конгрессе «Инновационные технологии в иммунологии и аллергологии» (Москва, 2017), научно-практической конференции «Избранные вопросы инфекционной патологии Урала и Западной Сибири» (Екатеринбург, 2017), 10-м Ежегодном

Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 2018) и 5 Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (Новосибирск, 2018).

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Томск, 2018).

Диссертация выполнена в соответствии с темой научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, номер государственной регистрации АААА-А16-116021010221-1 от 10 февраля 2016 года.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России по дисциплине «Инфекционные болезни» и в теме практического занятия «Клещевые инфекции (клещевой энцефалит, иксодовые клещевые боррелиозы, эрлихиозы, клещевой риккетсиоз)» для студентов, обучающихся по специальностям «31.05.01 Лечебное дело» и «31.05.02 Педиатрия», а также в лекции на тему «Клещевой энцефалит» для врачей-инфекционистов, обучающихся на цикле общего усовершенствования, и ординаторов, осваивающих программу подготовки кадров высшего образования по специальности 31.08.35 – «Инфекционные болезни» с 2018-2019 учебного года, а также в лечебно-диагностический процесс инфекционной клиники ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 4 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные

результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 1 статья в журнале, входящем в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus).

Структура работы

Диссертация изложена на 145 страницах, состоит из введения, 4 глав (аналитического обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения), практических рекомендаций, выводов, списка условных сокращений и списка литературы, включающего 183 источника, из которых 72 отечественных и 111 зарубежных. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 14 рисунками.

Личный вклад автора

Основные результаты настоящего исследования, включавшие отбор участников исследования, архивных историй болезни, анализ эпидемиологических, клинических и лабораторных параметров, создание электронной базы данных, взятие материала от больных на иммунологические, цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследования, а также анализ, обобщение и статистическая обработка собственных результатов, включая определение прогностических критериев и создание математических моделей, получены автором самостоятельно. Кроме того, автор участвовал в анализе цитологических препаратов микроядерного теста, в получении культур мононуклеарных клеток и оценке продукции цитокинов в супернатантах этих культур. Изучение литературы по теме диссертации и написание диссертации выполнено лично автором. Диссертант участвовал во всех этапах обсуждения полученных результатов и их опубликования.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Использование математических моделей и алгоритмов для прогноза тяжести течения инфекционных заболеваний

Известно, что КЭ является одной из наиболее распространенных природно-очаговых инфекций, сопровождающихся развитием как относительно благоприятно протекающих лихорадочных форм, так и более тяжелых – менингеальных и, в особенности, очаговых форм [16, 87]. Установлено, что тяжесть течения КЭ варьирует в различных географических регионах и во многом зависит от генотипа вируса. Согласно опубликованной информации наиболее тяжелое клиническое течение имеет КЭ, вызванный дальневосточным генотипом этого вируса [3, 37, 87]. ОФ КЭ характеризуется наличием стойких очагов поражения нервной ситемы в остром периоде инфекции. В том числе, отмечается нарушение сознания от сонливости и сопора до комы, возможны возбуждение, тремор конечностей, фасцикуляции языка, головокружение, нарушение когнитивных функций, мозжечковые расстройства, центральные и/или вялые парезы с вовлечением в процесс черепных и спинномозговых нервов. Полиоэнцефаломиелит является наиболее тяжелой формой КЭ, характеризующейся вялым парезом, который чаще развивается на пике фебрильной лихорадки [16, 87]. Менингеальная форма КЭ обычно сопровождается высокой температурой, головной болью, тошнотой, рвотой, менингеальными симптомами и патологическими изменениями спинномозговой жидкости различной степени выраженности [16, 87]. Вместе с тем, в случае тяжелого течения МФ КЭ менингеальные симптомы могут появляться на фоне сомноленции и психомоторного возбуждения, а также рассеянной неврологической симптоматики, отражающей заинтересованность отдельных черепных нервов и серого вещества головного мозга [16, 87]. Поэтому одной из проблем диагностики КЭ является раннее распознавание ОФ, которую сложно

прогнозировать в начале заболевания и дифференцировать от тяжело протекающей МФ [16, 87].

Одним из современных направлений диагностики является разработка математических моделей, диагностических алгоритмов и классификаторов, которые могли бы использоваться практическими врачами для формирования групп риска тяжелого течения и/или исходов некоторых болезней. В литературе имеются публикации, посвященные разработке таких моделей при различных инфекционных заболеваниях, отличающихся тяжелым течением и исходами [23, 160, 165]. Одним из таких заболеваний является лихорадка денге, вызванная также как и КЭ флавивирусом. Рядом авторов предпринята попытка создания математических моделей для раннего и точного прогноза тяжелой формы лихорадки денге, сопровождающейся развитием гиповолемического шока, на основании клинических признаков и симптомов [148, 160] поскольку, также как и в случае КЭ, врачи нуждаются в более эффективных инструментах для оценки риска этого варианта течения заболевания. В настоящее время для лихорадки денге разработаны несколько алгоритмов и классификаторов для прогноза и дифференциального диагноза, опирающихся на неспецифические клинико-лабораторные признаки и симптомы [96, 101, 160].

Н. С. Миноранской с соавт. [23] определены наиболее информативные клинико-лабораторные предикторы хронизации инфекционного процесса ещё одной инфекции, передающейся клещами – иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) в острый период заболевания. В результате ROC-анализа клинико-лабораторных показателей, регистрируемых в острую фазу болезни, у пациентов с хроническим течением ИКБ выявлены наиболее информативные клинико-лабораторные предикторы прогноза исходов заболевания, включая значения концентрации ИЛ-8 в сыворотке крови [23].

В литературе имеются также попытки создания математических моделей для прогнозирования течения менингитов и энцефалитов различной этиологии. Например, с помощью метаанализа идентифицированы прогностические критерии летального исхода и/или осложнений бактериальных менингитов у

детей [149]. К числу факторов риска, имеющих «хорошее» и «очень хорошее» качество прогноза тяжелого течения и/или летального исхода бактериальных менингитов, согласно данным, полученным этими авторами, можно отнести следующие: нарушение сознания вплоть до комы и судорог (длительного характера), продолжительный лихорадочный период, появление признаков недостаточности периферического кровообращения, инфекционно-токсического шока и тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома, выделение из ликвора *Streptococcus pneumoniae*, мужской пол, младший детский возраст, а также изменение некоторых параметров цереброспинальной жидкости и общего анализа крови, включая снижение числа лейкоцитов в периферической крови, относительно низкие уровни лейкоцитов и глюкозы, при одновременно высокой концентрации белка в спинномозговой жидкости [149]. A. Schmidt с соавт. [137] проведено изучение прогностических факторов риска летального исхода энцефалитов неуточненной этиологии в ранний период заболевания. В результате установлено, что пожилой возраст, нарушение сознания, повышенный С-реактивный белок в сыворотке крови или увеличение числа нейтрофилов в ликворе ассоциированы с летальным исходом больных энцефалитом.

Таким образом, результаты исследований, выполненных различными авторами, свидетельствуют о возможности прогнозирования тяжести течения инфекционного процесса в ранний период инфекционной патологии и формирования групп риска на основе оценки клинико-эпидемиологических данных, продукции иммуноцитокинов и других лабораторных тестов с использованием современных методик статистического анализа и прогноза.

1.2 Характеристика клинико-эпидемиологических и лабораторных прогностических критериев риска тяжелого течения клещевого энцефалита

Клинические проявления КЭ достаточно полно описаны в классических монографиях, посвященных этой инфекции [12, 16]. За последние 10 лет в литературе, посвященной КЭ, авторы в своих работах описывали факторы

риска, показатели и симптомы, характерные для течения той или иной клинической формы КЭ [7, 13, 14, 22, 26, 42, 50, 52].

К эпидемиологическим факторам риска развития ОФ КЭ ряд авторов [5, 7, 14, 22, 26, 38, 46, 50, 63, 139] относили отрицание факта присасывания клеща и, как следствие этого, более позднюю госпитализацию от момента начала первых симптомов заболевания. Многие больные либо стряхивали клещей с кожи, одежды, снимали с домашних животных или с других людей, либо не замечали присасывания и проползания клещей во время посещения леса, садово-огородных участков и, как следствие, не обращались в пункты серопрофилактики клещевых инфекций.

Некоторые авторы указывают на то, что для больных ОФ КЭ, по сравнению с пациентами ЛФ, более характерны множественные укусы клещей, а тяжесть заболевания и риск летального исхода напрямую зависит от количества укусов, что можно объяснить более значительной инфицирующей дозой вируса [14, 26, 27, 38, 41, 46, 63, 65, 66, 175, 183].

Ряд авторов отмечают, что наиболее высокая частота встречаемости ОФ и повышенный риск летального исхода при КЭ ассоциированы с присасыванием клеща в области головы [24, 45].

Известно, что ОФ гораздо реже встречаются у детей 7−14 лет, по сравнению со всеми прочими возрастными группами, и, наоборот, наиболее высокая частота ОФ регистрируется среди пациентов 50 лет и старше, а МФ – в возрасте 40–49 лет [6, 41]. Большинство исследователей сходятся во мнении, что КЭ особенно тяжело протекает у лиц старше 60 лет [6, 25, 64, 67, 156, 175, 183, 169].

В некоторых работах принадлежность к мужскому полу рассматривают как один из факторов риска ОФ КЭ [24, 45], что объясняют более активной деятельностью мужчин на открытом воздухе, более редким обращением в пункты серопрофилактики после укуса клеща, а также различиями иммунного ответа на вирус КЭ у мужчин и женщин. Однако большинство авторов не обнаружили какой-либо статистически значимой связи между полом и риском развития ОФ или летальным исходом [6, 41].

Результаты исследований большинства авторов показали, что ОФ КЭ среди лиц, проводивших экстренную профилактику и полный курс вакцинации, встречались достоверно реже, чем ЛФ [7, 22, 38, 46, 47, 52].

Многие авторы не выявляли четкой зависимости между продолжительностью инкубационного периода, клинической формой и тяжестью течения КЭ [22, 38, 26, 50]. Вместе с тем, в работах некоторых авторов выявлена достоверно большая продолжительность инкубационного периода при ОФ КЭ, по сравнению с ЛФ и МФ этой инфекции. Однако при молниеносных ОФ болезни с летальным исходом зарегистрирован наиболее короткий период инкубации, по сравнению с остальными формами болезни [6, 7].

По данным А. Б. Коньковой-Рейдман с соавт. и А. Л. Бондаренко с соавт. [5, 14, 22, 27 30, 52], которые привели подробную характеристику клинической картины МФ КЭ, наиболее часто у больных наблюдались лихорадка, сопровождающаяся ознобом и диффузным гипергидрозом с максимальной температурой тела 39,2 ^{o}C и длительностью около 7 дней в случае среднетяжелого течения и 9−10 суток при тяжелых формах, а также менингеальные симптомы, тяжесть которых прямо коррелировала с тяжестью заболевания. Установлено, что увеличение показателя плеоцитоза у больных МФ КЭ имело прямую зависимость от степени тяжести менингеальной симптоматики [30, 50]. Кроме того, у больных МФ КЭ наблюдалось умеренно выраженное повышение общего белка в ликворе, хлориды и глюкоза оставалась в пределах нормы, хотя в случае тяжелого течения была отмечена тенденция к гипергликорахии [30].

По данным большинства исследователей, высота и динамика температуры тела в первые дни болезни, а также длительность лихорадочного периода имеет важное прогностическое значение для оценки риска ОФ КЭ [7, 13, 50]. Показано, что у больных ОФ КЭ, в отличие от пациентов с ЛФ и МФ этой инфекции, общеинфекционный синдром сопровождался более продолжительной слабостью, отсутствием аппетита, а также более выраженными артралгиями, миалгиями, головной болью и тошнотой [22, 52]. По данным А. Л. Бондаренко с соавт. [14, 22, 26,52], одним из ранних факторов риска менингоэнцефалитического варианта ОФ

КЭ было появление на первой неделе психопатологических симптомов, тахипноэ, судорожного синдрома, нарушения координации движений, свидетельствующих о мозжечковой дисфункции. По данным этих авторов, к концу первой недели заболевания у большинства больных регистрировалось нарушение сознания, после чего появлялись поражения черепных нервов и центральные парезы конечностей [14, 26, 27].

Согласно данным, полученным В. В. Проворовой [50], появление грубой ригидности затылочных мышц и симптома Кернига, а также указания на появление рвоты в первые дни болезни можно рассматривать как важные прогностические признаки ОФ КЭ. В. В. Проворова [50] к числу наиболее неблагоприятных симптомов тяжелого течения ОФ и летального исхода заболевания относит бледность кожных покровов, что может свидетельствовать о дыхательной недостаточности и гемодинамических нарушениях.

Клиническая картина больных с полиоэнцефаломиелитическим вариантом ОФ КЭ [14, 26] характеризуется вовлечением в процесс черепных нервов бульбарной группы в течение первой недели заболевания. Нарушение сознания, психопатологические расстройства, а также мозжечковый синдром и вялые парезы в этой группе больных чаще наблюдаются в более поздние сроки, чаще на второй неделе болезни.

В литературе относительно мало данных о КЭ с летальным исходом. Установлено, что летальные исходы наиболее часто регистрируются в старших возрастных группах (старше 50 лет), а также у детей [3, 37]. Клещевой энцефалит с летальным исходом может быть вызван как дальневосточным, так и сибирским генотипом этого вируса [3, 37, 141].

Рядом исследователей показано, что ОФ КЭ в первые дни болезни наиболее часто сопровождается нейтрофильным лейкоцитозом, сдвигом лейкоцитарной формулы влево с увеличением относительного числа палочкоядерных нейтрофилов [7, 22] и относительной лимфопенией, тогда как для более легко протекающей ЛФ или МФ характерны нормоцитоз или умеренная лейкопения с нормальным или немного сниженным относительно нормального уровня

содержанием нейтрофилов и незначительно выраженным лимфоцитозом в периферической крови [5, 7,14, 22, 28, 30, 50, 52].

Изменения показателей ликвора по данным разных исследователей носят довольно противоречивый характер: одни авторы отмечают появление более выраженного плеоцитоза чаще нейтрофильного или смешанного характера, а также более высокий показатель концентрации белка в ликворе у больных ОФ, по сравнению с МФ КЭ [22, 30,52], а другие авторы, напротив, говорят о умеренно выраженном увеличении числа лейкоцитов в ликворе у пациентов с ОФ, чем в группе с МФ КЭ [50].

1.3 Характеристика иммунного ответа и цитокинового статуса при различных клинических формах клещевого энцефалита

В исследованиях, посвященных иммунофенотипированию лимфоцитов у больных ЛФ КЭ в острый период заболевания, выявлено повышение числа активированных Т-лимфоцитов (CD3+CD25+, HLA-DR+CD3+CD95+) и CD16+ NK-клеток, по сравнению с контролем и/или другими клиническими формами этой инфекции [28, 32, 33]. В то же время, у больных МФ и, в особенности, ОФ КЭ, по сравнению с пациентами с более легко протекающей ЛФ и здоровым контролем, выявлено значительное снижение в периферической крови числа CD4+-лимфоцитов, необходимых для пролиферации и дифференцировки В-клеток, а также существенное уменьшение числа CD8+-лимфоцитов и CD25+ активированных лимфоцитов, что может свидетельствовать о дефиците цитотоксических лимфоцитов, играющих ключевую роль в противовирусном ответе [19, 28, 58, 61]. По данным Л. И. Ратниковой с соавт. [53], уровень CD95+-позитивных клеток, взаимодействующих с ФНО-α в периферической крови, выше у больных ЛФ КЭ, тогда как при МФ он остается в пределах нормальных значений, что подтверждает предположение о том, что острая инфекция КЭ сопровождается вирусиндуцирующим апоптозом при ЛФ КЭ, тогда как при МФ гибель

инфицированных клеток идет по пути некроза и утяжеляет клиническую картину заболевания [53]. По данным Н. В. Крыловой с соавт. [28], у больных ОФ КЭ с благоприятным исходом обнаружено отсутствие увеличения количества CD25+Т-лимфоцитов на фоне повышения содержания Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер апоптоза CD95, что свидетельствует о сниженной активации Т-лимфоцитов. У пациентов с летальным исходом в острую фазу заболевания соотношение CD25+/CD95+ зафиксировано выше нормы, что свидетельствует о том, что процесс накопления активированных лимфоцитов преобладает над процессом их элиминации из периферической крови.

Известно, что поляризация иммунного ответа в сторону Th1-типа приводит к доминированию клеточного звена, в то время как преобладание дифференцировки CD4+ клеток в направлении Th2-типа способствует стимуляции преимущественно гуморального ответа. Показано, что у больных ЛФ КЭ цитокиновый статус характеризуется умеренным увеличением продукции в сыворотке крови и в культуре лимфоцитов провоспалительных цитокинов Th1- типа, включая ИЛ-8, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-1β, ИФ-α и ФНО-α, при одновременном снижении секреции противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4), по сравнению с соответствующими показателями у здоровых лиц, и неизменной концентрацией ИЛ-10, по сравнению с контролем, что свидетельствует о поляризации иммунного ответа в сторону доминирования Th1-пути и активации противовирусного Т-клеточного звена [20, 21, 28, 33, 53, 58]. Вместе с тем показано, что у больных МФ КЭ, по сравнению с больными ЛФ заболевания, уровни провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, таких как ИЛ-8 и ФНО-α повышены, концентрации ИФ-α и ИФ-γ значительно снижены, а продукция ИЛ-10 оставалась неизменной [11, 53, 58, 61]. При этом соотношение ИЛ-18/ИЛ-10 (клеточный/гуморальный иммунитет) в группах больных ЛФ и, в особенности, МФ КЭ было существенно выше, чем в группе контроля, в то время как у больных ОФ КЭ обнаружены признаки дефицита Т-клеточного иммунного ответа, поскольку вышеназванное соотношение оказалось достоверно ниже, чем в группе здоровых лиц [5, 14, 22, 52]. Известно, что чрезмерная

продукция провоспалительных цитокинов способствует повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для вирусов, что может способствовать развитию МФ и ОФ КЭ [172]. Снижение секреции иммунокомпетентными клетками больных МФ и ОФ КЭ интерферонов (ИФ-α и ИФ-γ), свидетельствует о нарушении противовирусной защиты организма у этих групп больных [28, 53, 58].

В исследованиях Н.В. Крыловой [28, 33] показано, что у больных ОФ КЭ с благоприятным исходом наблюдается дефицит Т-клеточного звена иммунитета, отсутствие признаков Т-клеточной активации, дисиммуноглобулинемия и низкий уровень продукции Th1-цитокинов, в то время как в случае ОФ с летальным исходом обнаружена ранняя гиперпродукция Th1-цитокинов и компонентов комплемента, снижение количества активированных Т-лимфоцитов, уменьшение числа натуральных киллеров NK-клеток и CD8+-цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+). В иммунном статусе прогностическими критериями тяжелого течения КЭ отмечено значительное уменьшение числа CD3+CD4+-Т-лимфоцитов, NK-клеток, иммуноглобулинов (IgG1, IgG3), повышение количества В-лимфоцитов, а также увеличение концентраций цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 [22, 28, 33, 52 61]. В результате анализа результатов цитокинового статуса установлено, что предиктором ОФ с благоприятным исходом может быть значительное снижение продукции провоспалительных цитокинов в сыворотке больного, включая ИЛ-8, ИЛ-18, ИЛ-1β, ФНО-α и ИФ-γ, отсутствие стимуляции продукции в культуре ИФ-α, повышение концентрации ИЛ-6 в сыворотке крови и ранний дисбаланс продукции Th1/Th2 цитокинов, направленный в сторону доминирования Th2-цитокинов, что свидетельствует о дефиците цитотоксического Т-клеточного звена иммунного ответа [28, 33].

У больных ОФ КЭ также обнаружено существенное повышение ИЛ-10 в сыворотке крови по сравнению с пациентами с другими клиническими формами болезни, что может указывать на подавление избыточной продукции провоспалительных цитокинов и ограничение воспалительной реакции [5, 14, 52].

В то же время летальный исход у больных ОФ характеризуется дисфункцией системы цитокинов активационного типа, включая гиперпродукцию провоспалительных цитокинов, превалированием Th1-типа иммунного ответа и резким снижением резервного потенциала иммунокомпетентных клеток [28, 33].

В исследованиях с использованием экспериментально инфицированных животных, продемонстрировано, что в случае летальной инфекции у зараженных вирусом КЭ животных развивался SIRS (systemic inflammatory response syndrome – синдром системного воспалительного ответа), который сопровождался выбросом в кровоток провоспалительных цитокинов – ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-12 [15, 81]. В то же время, повышение продукции противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-13) у больных ОФ и у экспериментально зараженных животных с благоприятным исходом инфекции можно объяснить развитием у них в ответ на SIRS компенсаторного противовоспалительного ответа – CARS (compensatory antiinflammatory response syndrome) [28, 33, 81], поскольку известно, что для благоприятного исхода инфекционного процесса требуется соблюдение баланса между провоспалительными и противовоспалительными факторами [89, 95].

1.4 Характеристика цитогенетических нарушений, индуцированных вирусами, и их связь с окислительным стрессом

Известно, что реактивные виды кислорода (ROS) и оксида азота (NO) необходимы для нормального функционирования иммунной системы организма, внутриклеточного киллинга бактерий и противовирусного ответа Т-клеток, которые обеспечивают врожденный и приобретенный иммунитет [83, 126]. Однако, когда реактивные формы кислорода и оксида азота, продуцируемые активированными нейтрофилами и макрофагами, уничтожают микробы или вирусы, то повреждаются соседние клетки и чрезмерная секреция этих свободных радикалов вызывает окислительный стресс, индуцирующий повреждения ДНК,

геномную нестабильность, дисфункцию ферментов и апоптоз клеток [105, 110, 156]. Поэтому любой дисбаланс между уровнем производства ROS и/или оксида азота и неспособностью организма их детоксифицировать называется окислительным стрессом [155, 164]. Свободные радикалы из-за их высокой реакционной способности, могут приводить к повреждению макромолекул, включая ДНК, РНК и ферментов, биологических мембран и клеток [48, 135]. Эти реакции также включают окисление полиненасыщенных жирных кислот, являющихся компонентами биологических мембран, что прямо коррелирует с образованием реактивных альдегидов, включая малоновый диальдегид (МДА) [135].

В настоящее время активно изучается роль ROS, NO и инициируемого ими процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) и повреждения макромолекул, включая ДНК, в патогенезе онкологических, воспалительных, инфекционных и других заболеваний [1, 39, 55, 109, 135, 163]. Установлено, что многие воспалительные и инфекционные заболевания, сопровождаются повышением образования МДА [39, 109].

Показано, что как ДНК-, так и РНК-содержащие вирусы способны как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* вызывать окислительный стресс. Например, показано, что в эксперименте *in vitro* с использованием культуры клеток, зараженных вирусом Эпштейна-Барр, а также в периферической крови больных цитомегаловирусной инфекцией обнаружена избыточная продукция ФНО-α, которая положительно коррелирует с концентрацией МДА [18, 109]. Установлено, что больные ВИЧ-инфекцией, хроническим вирусным гепатитом (ВГ) В или С также демонстрируют повышенные уровни ПОЛ, включая увеличение концентрации МДА, и слабую антиоксидантную защиту из-за низкой активности каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) [76, 115, 138, 155, 164]. Окислительный стресс при вирусных инфекциях, вызванных РНК-содержащими вирусами, может способствовать нескольким аспектам патогенеза, включая повреждение клеточной ДНК, инициацию апоптоза различных типов клеток, подавление пролиферации Т-лимфоцитов, регуляцию репликации вируса,

воспалительной реакции и потери массы тела больного [126, 155, 164]. Показано, что в плазме крови больных хроническим ВГС обнаружены высокие уровни супероксид анион радикала, МДА, других продуктов ПОЛ, которые прямо коррелируют с концентрацией провоспалительного цитокина ФНО-α [152].

Установлено, что повышенная частота цитогенетических нарушений в клетках у больных ВИЧ-инфекцией связана не с прямым воздействием вируса на хромосомы, а с активацией окислительного стресса и продукцией эндогенных кластогенов, к числу которых можно отнести ФНО-α, МДА и 4-гидроксиноненал. Одновременно у этих больных выявлена тенденция к снижению концентрации антиоксидантов в плазме, включая глутатион, витамин С, селен и цинк [108].

У больных лихорадкой денге, а также в экспериментах на животных, зараженных вирусом лихорадки денге серотипа 2, установлено, что инфекция приводит к повышенным уровням в сыворотке крови МДА и провоспалительных цитокинов, таких как ФНО-α, ИФ-γ, ИЛ-6, по сравнению со здоровым контролем [77, 129]. Наиболее высокие значения этих показателей установлены у больных с тяжелым и осложненным течением лихорадки денге, а определение соотношения ФНО-α / ИФ-γ предложено в качестве важного прогностического критерия шока при этом заболевании [77]. В исследовании также обнаружена положительная корреляция между концентрацией МДА в сыворотке и уровнями ФНО-α и/или соотношения ФНО-α / ИФ-γ в случае тяжелого течения лихорадки денге [77].

При КЭ также доказано повышение продукции свободных радикалов и их производных соединений, включая МДА и метаболитов оксида азота, что сопровождается значительным угнетением антиоксидантной антирадикальной системы защиты [31, 44, 135, 180].

Известно, что ДНК повреждение может быть индуцировано как эндогенными процессами в клетках, так и экзогенными мутагенными факторами, в результате чего могут накапливаться десятки тысяч повреждений на клетку каждый день [130].

В настоящее время выделяют три основных класса эндогенных химических кластогенов, образующихся в результате воспалительного процесса: 1) продукты

ПОЛ, включая МДА и альдегид 4-гидроксиноненал, 2) провоспалительные цитокины, такие как ФНО-α и 3) необычные нуклеотиды, такие как инозин ди- и трифосфат [108].Супероксид анион радикал или оксид азота не являются прямыми повреждающими агентами, а представляют собой инициаторов ряда событий, ведущих к повреждению ДНК и образованию хромосомных аберраций [108]. Эндогенные клеточные процессы, вызывающие повреждение ДНК, включают окислительный стресс, сопровождающийся образованием реакционноспособных форм кислорода (ROS), которые индуцируют повреждение нуклеотидов, ошибки ДНК-полимеразы во время репликации. Это, в свою очередь, может вызвать нарушения правильного функцирования таких ферментов как ДНК топоизомеразы I и II и способно привести к разрыву цепи ДНК и хроматидным аберрациям [91].

К числу экзогенных факторов, можно отнести не только химические мутагены, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, но и различные инфекционные агенты, включающие вирусы, бактерии и даже гельминты [113]. В настоящее время можно считать доказанным, что ДНК- и РНК-содержащие вирусы в условиях культуры клеток *in vitro* или *in vivo* у больных людей и в экспериментах с использованием инфицированных животных способны вызывать повышенные уровни повреждений ДНК и цитогенетических нарушений [116, 179, 182].

Известно, что РНК-содержащие вирусы вызывают заболевания, многие из которых склонны к персистенции или/и хроническому прогрессирующему течению, включая вирус КЭ и вирус гепатита С [155]. Показано, что РНК-вирусы могут взаимодействовать с ДНК во время их репликативных циклов и способны повреждать ДНК как через прямой, так и через опосредованные механизмы [155, 158].

Установлено, что общим механизмом косвенного эндогенного повреждения ДНК при всех инфекциях, вызванных РНК-содержащими вирусами, является повышенная генерация ROS и NO, приводящая к окислительному стрессу [143, 155, 182]. Повреждение ДНК инициирует в клетке целый каскад реакций, которые

называются ответом на повреждение ДНК [94]. Известно, что если повреждение ДНК невозможно восстановить с помощью системы ДНК репарации, то это приводит к остановке митотического цикла в такой клетке, переходу в состояние старения, активации проапоптотических белков, таких как Bax, и её гибели путем апоптоза [94, 157].

Установлено, что многие вирусы вызывают активацию ответа на повреждение ДНК в течение их жизненных циклов [158, 182]. Это может произойти либо как результат прямого взаимодействия вирусных белков с ДНК и индукции ими ДНК-мутаций, либо как часть противовирусного ответа иммунной системы, направленного на уничтожение вирусных геномов [158]. При этом, показано, что различные вирусы могут как способствовать, так и препятствовать апоптозу определенных типов клеток [158, 182]. В ряде случаев повышенная активация апоптоза некоторых типов клеток, например Т-лимфоцитов, может в значительной степени способствовать вирусному патогенезу и приводить к существенному нарушению противовирусного ответа [118].

Некоторые РНК вирусы, включая вирус гепатита С, развили механизмы ингибирования или замедления процесса апоптоза, направленные на персистенцию возбудителя, хронизацию инфекционного процесса и стимуляцию онкогенеза [116, 158]. Установлено, что вирус гепатита С, а также вирус лихорадки Рифт−Валли (сем. Bunyaviridae), способны индуцировать повреждение клеточной ДНК и хромосомные аберрации через стимуляцию окислительного стресса, а также в результате взаимодействия вирусных белков с киназой ATM (от англ. ataxia telangiectasia mutated), которая активирует сверочную G1/S- точку клеточного цикла и вызывает остановку деления клетки в S-фазе в случае повреждения ДНК [94, 117, 123, 154]. Установлено, что за счет этих механизмов инфекция ВГС ингибирует процессы репарации ДНК, что также приводит к росту хромосомной нестабильности как в клетках иммунной системы, так и в гепатоцитах. Эти эффекты могут объяснить онкогенность ВГС и неадекватный иммунный ответ на этот вирус [117, 132]. В настоящее время доказано, что повреждение ДНК с вовлечением различных механизмов может быть вызвано

рядом других РНК-содержащих вирусов, например, вирусом гриппа (сем. Orthomyxoviridae) [127], коронавирусами (сем. Coronaviridae) [99] и вирусом лихорадки Чикунгунья (сем. Togaviridae) [124].

Известно, что инфекция вируса КЭ и некоторых других родственных вирусов, например, вируса Японского энцефалита, также вызывает повреждение ДНК и хромосомные аберрации, что впервые установлено ещё в 70-е годы прошлого века и нашло подтверждение в дальнейших исследованиях [17, 54, 69,70]. Этими авторами высказано предположение, что подобные цитогенетические аберрации в иммунокомпетентных клетках могут явиться причиной их функциональных нарушений, а также способны инициировать апоптоз Т-лимфоцитов, приводящий к нарушению иммунного и противовирусного ответов.

В последние десятилетия к числу наиболее широко используемых цитогенетических тестов можно отнести определение частоты клеток с микроядрами (МЯ) в буккальном эпителии. Это связано с легким доступом к слизистой оболочке полости рта, минимальной инвазивностью и безболезненностью методики. Кроме того, слизистая оболочка полости рта как зеркало отражает здоровье человека и претерпевает изменения в случае болезни, а также является местом контакта с потенциальными мутагенными веществами, содержащимися в пище и табаке [142, 180]. Прямая корреляция между частотой клеток с МЯ в буккальном эпителии и частотой лимфоцитов с МЯ в периферической крови свидетельствует о том, что системные генотоксические эффекты в кровотоке находят свое отражение в эпителиальных клетках полости рта [120, 171]. Доказана прямая связь между окислительным стрессом и индуцируемыми им повреждениями ДНК и частотой МЯ в лимфоцитах периферической крови и в буккальных клетках [120, 148, 171]. В частности, установлена прямая корреляционная зависимость между частотой буккальных клеток с МЯ и концентрацией МДА в сыворотке крови у женщин с синдромом поликистозных яичников [145]. Поэтому оценку частоты клеток с МЯ используют как прогностический критерий тяжести некоторых воспалительных и

инфекционных заболеваний, а также для определения риска онкологических заболеваний [75, 106, 122, 140, 145].

Микроядром (МЯ) называют небольшие хроматиновые структуры в цитоплазме клетки, состоящие из отставшей целой хромосомы или её фрагмента, которые образуются на стадии митоза в результате различных типов хромосомных аберраций [102, 142]. Известно, что образование МЯ может происходить спонтанно, однако, в присутствии эндогенных или экзогенных мутагенных факторов, частота клеток с МЯ значительно увеличивается [180]. Микроядерный тест имеет множество преимуществ по сравнению с другими цитогенетическими методами, включая быстроту и простоту выполнения методики, дешевизну, минимальную инвазивность и безболезненность, что делает этот метод пригодным для массовых скрининговых обследований [147, 180].

Наличие МЯ можно оценить не только с использованием стимулированных к пролиферации культур Т-лимфоцитов, но и в эпителиоцитах многих типов тканей, например, в клетках эпителия шейки матки, мочевого пузыря, пищевода, бронхиальной, носовой и буккальной слизистой оболочки [140, 142, 180]. Исследования *in vivo* показали, что частота лимфоцитов с МЯ периферической крови обратно коррелирует с содержанием в пище и концентрациями в плазме различных витаминов и антиоксидантов [177]. Установлено, что частота различных типов цитогенетических нарушений и повреждений ДНК, включая микроядра, структурные хромосомные аберрации, разрывы нитей ДНК, прямо зависят от возраста человека [167].

1.5 Роль полиморфизма некоторых генов как один из факторов риска клинически более тяжелых форм клещевого энцефалита и других инфекций

Факторы, определяющие тяжесть клинического течения КЭ, выяснены не полностью. Известно, что белок TLR3 экспрессируется в дендритных и эпителиальных клетках, а также в клетках головного мозга [133, 177]. Белок TLR3 связывается с вирусной РНК, что инициирует в ядре клеток экспрессию

транскрипционных факторов: ядерного фактора каппа В (NF-κB) и регуляторного фактора интерферона 3 (IRF3), последний из которых активирует транскрипцию ИФ-α и -β, а также провоспалительных цитокинов, в частности ФНО-α, которые уменьшают целостность ГЭБ и облегчают проникновение вируса КЭ в головной мозг [133, 177]. В результате ряда экспериментов с использованием зараженных животных высказано предположение, что проникновение вирусов КЭ и лихорадки Западного Нила (ЛЗН) через ГЭБ ассоциировано с вовлечением сигнального маршрута, включающего Толл-подобный рецептор 3 (TLR3) и провоспалительные цитокины, такие как ФНО-α, фактор ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), ИЛ-6 и ИЛ-1β [90, 177]. Затем, в результате клинических исследований установлено, что в группе больных МФ КЭ существенно увеличена концентрация ИЛ-1β, MIF и ФНО-α в сыворотке крови, в особенности в подгруппе больных, имеющих мутацию *rs5743305TT*, сопровождающуюся повышенной экспрессией гена *TLR3* [83, 172]. Кроме того, показано, что несколько однонуклеотидных полиморфизмов генов интерлейкина 28В (ИЛ-28В) и ИЛ-10 (*rs1800872*) статистически значимо связанны с предрасположенностью к КЭ в русской популяции [79]. Установлено, что люди, имеющие мутацию *CCR5D32−* нефункциональный хемокиновый рецептор 5 (CCR5), имеют повышенный риск развития манифестного течения КЭ [146]. Известно, что ген *CCR5* кодирует белок, экспрессированный на поверхностях лейкоцитов, которые участвуют в регуляции миграции лейкоцитов [93]. Однако делеция этого гена, в отличие от мутации гена *TLR3*, по-видимому, не влияет на тяжесть заболевания и не повышает риск поражения ЦНС у больных КЭ [146, 170].

Известно, что определенные аллели пяти однонуклеотидных полиморфизмов в генах 2'-5'-олигоаденилатсинтетазы*OAS2* и *OAS3* (семейства ферментов, связаных с взаимодействием интерферонов с рецепторами на поверхности клеток-мишеней) ассоциированы с предрасположенностью к развитию тяжелых форм КЭ в русской популяции [49, 190].

Таким образом, установлено, что клиническая форма КЭ и вовлечение в процесс ЦНС и/или мозговых оболочек зависят от экспрессии медиаторов воспалительного ответа, который, в свою очередь, ассоциирован с генетической предрасположенностью макроорганизма [83, 172].

В настоящее время показано, что полиморфизм генов *GSTM1* и *GSTT1*, связанный с делецией этих генов играет важную роль в повышенном риске тяжелого течения некоторых инфекционных заболеваний, таких как туберкулез, малярия, ВИЧ-инфекция и геморрагическая лихорадка с почечным синдромом [51, 59, 107, 119]. Гены *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1* кодируют класс ферментов глутатион-S-трансфераз (GST), которые катализируют присоединение трипептида глутатиона к электрофильному центру разнообразных соединений, что приводит к образованию более гидрофильных и менее токсичных продуктов [86]. Известно, что гены *GSTM1* и *GSTT1* могут иметь относительно протяженную делецию, приводящую к утрате функционирования этих генов, которую обычно обозначают как «нулевой» аллель *GSTM1* (0/0) или *GSTT1* (0/0) [36, 85]. Установлено, что полиморфизм генов GST может влиять на уровень повреждений ДНК, вызванных рядом мутагенных и/или канцерогенных соединений эндогенного и экзогенного происхождения и тесно связан с индивидуальной восприимчивостью к этим веществам [36, 85, 144]. На примере, больных туберкулезом легких, установлено, что комбинация «нулевых» генотипов *GSTM1* и *GSTT1* является предиктором выраженных и длительно сохраняющихся симптомов интоксикации и клинических проявлений при этой инфекции [59]. В результате изучения полиморфизма генов ферментов детоксикации ксенобиотиков – цитохрома P450 *CYP1A1* и глутатион-S-трансферазы *GSTP1* у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС) в зависимости от формы тяжести этой инфекции установлено, что гетерозиготный генотип AG полиморфного локуса *A313G* гена глутатион-S-трансферазы *GSTP1* ассоциирован с повышенной предрасположенностью к ГЛПС, а комбинация полиморфного локуса *A2455G* гена цитохрома P-450 1A1 (*CYP1A1*) и полиморфного локуса *A313G* гена *GSTP1* встречалась только при тяжёлой форме

ГЛПС [51]. Установлена прямая зависимость между повышенным риском тяжелого и осложненного течения трехдневной или/и тропической малярии и наличием у больного делеции гена *GSTM1* [119]. На примере больных с микст-инфекцией ВИЧ и хронического ВГС установлено, что больные-носители делеции гена *GSTM1* имели существенно более низкое число клеток CD4+, более высокую вирусную нагрузку ВИЧ, а также значительно повышенные уровни повреждений ДНК в результате активации окислительного стресса [107].

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Общая характеристика обследованных групп пациентов и объем проводимых исследований

Работа выполнена на базах инфекционной клиники ФГБОУ ВО Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) Минздрава России и инфекционных отделений областного государственного автономного учреждения здравоохранения (ОГАУЗ) «Городской клинической больницы № 3 им. Б. И. Альперовича» и ОГАУЗ «Медико-санитарной части «Строитель»» г. Томска. Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протоколы № 993 от 27.04.2009 г. и № 4308 от 19.10.2015 г.) и проводилось после получения информированного согласия на участие в исследовании в соответствии с правилами «О порядке проведения биомедицинских исследований у человека» (2002 г.) и «Правилами клинической практики» (Приказ Минздрава РФ № 266 от 19.06.03).

В общей сложности в исследование включено 274 человека, в том числе 53 больных лихорадочной формой (ЛФ) КЭ, 138 больных менингеальной формой (МФ) КЭ, 20 больных очаговой формой (ОФ) КЭ с благоприятным исходом, 6 пациентов очаговой формой с летальным исходом (ОФЛИ), госпитализированных в стационары г. Томска в весенне–летний период 2003–2017 гг., а также контрольная группа, состоящая из 57 здоровых добровольцев (таблица 1).

Состав обследованных лиц по возрасту и полу следующий: группа больных ЛФ КЭ включала 50,9 % лиц мужского и 49,1 % и женского пола, возраст которых варьировал от 19 до 69 лет (43,2 ± 2,6 лет); группа больных МФ состояла из 69,6 % мужчин и 30,4% женщин в возрасте от 19 до 72 лет (35,9 ± 1,1 лет); группа больных ОФ КЭ включала 60,0 % мужчин и 40,0 % женщин в возрасте от 22 до 88 лет (47,5 ± 3,5 лет); группа больных ОФЛИ состояла из 66,7 % мужчин и 33,3 % женщин в возрасте от 20 до 72 лет (54,7 ± 7,0 лет). В качестве контрольной

группы участвовало 57 здоровых человека 54,4 % мужчин и 45,5 % женщин в возрасте (44,8 ± 3,3 лет), не болевших ранее КЭ или иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ), не подвергавшихся укусам клещей и имевших отрицательные результаты иммуноферментного анализа (ИФА) на маркеры КЭ и ИКБ (таблица 1).

Таблица 1 – Участники исследования, численность групп и возрастной состав

Описание группы	ЛФ	МФ	ОФ	ОФЛИ	Контроль	Всего
Число участников, n	53	138	20	6	57	274
Средний возраст, лет	43,2 ± 2,6	35,9 ± 1,1	47,5 ± 3,5	54,7 ± 7,0	44,8 ± 3,3	—

Среди больных ОФ КЭ преобладали больные с менингоэнцефалитическим вариантом. Однако у 5 из 20 пациентов с ОФ диагностированы полиомиелитический (3) или полиоэнцефаломиелитический (2) варианты. У всех (6) пациентов ОФЛИ диагностирован менингоэнцефалитический вариант течения заболевания.

Известно, что общепринятой клинической классификации КЭ нет [10]. Мы использовали клиническую классификацию, предложенную в 2014 г. Национальным научным обществом инфекционистов в клинических рекомендациях «Клещевой вирусный энцефалит у взрослых». В соответствии с этой классификацией все клинически манифестно протекающие случаи заболевания разделяют на неочаговые, включающие лихорадочную и менингеальную формы, а также очаговые формы, к которым относят менингоэнцефалитический, полиоэнцефалитический, полиомиелитический и полиоэнцефаломиелитический варианты [26].

Во всех случаях диагноз КЭ верифицирован методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в случае обнаружения положительных титров сывороточных иммуноглобулинов (Ig) класса М или одновременно IgM и IgG к вирусу КЭ с применением тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (г. Кольцово,

РФ). Исследование сыворотки крови проводили в динамике при поступлении больного в стационар (не ранее 6−7 дня от начала заболевания) и через 10−14 дней. Кроме того, для исключения сопутствующей патологии определялись титры IgM и IgG к боррелиям иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) в сыворотке крови в день обращения пациента и спустя 21 день от момента заболевания, выявлялась РНК энтеровирусов в спинномозговой жидкости с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также проводилось бактериологическое исследование ликвора на менингококк и группу условно-патогенных бактерий.

Исследование выполнено в дизайне рандомизированного выборочного клинического исследования типа «случай-контроль». Критериями включения в исследование для групп больных КЭ служили: поступление в стационар в срок не позднее 8 дня от начала лихорадки, при условии отсутствия очаговой симптоматики, обнаружение антигена и/или иммуноглобулинов IgM или одновременно IgM и IgG в диагностических титрах методом ИФА в крови пациента, отрицательные результаты исследования ИФА на определение в крови IgM или/и IgG к боррелиям ИКБ в сыворотке крови спустя 21 день от момента заболевания, отрицательные результаты ПЦР на обнаружение РНК энтеровирусов в спинномозговой жидкости, а также отрицательный результат бактериологического исследования ликвора на менингококк, стрептококк, стафилококк и группу условно-патогенных бактерий.

Данные для исследования получены двумя способами:

1) проспективно, в результате обследования больных − участников исследования, имевших различные клинические формы острого КЭ, с использованием не только общеклинических, но и иммунологических и цитогенетических методов в период с 2015 по 2017 гг.;

2) ретроспективно, в результате отбора и анализа эпидемиологических, анамнестических, клинических (включая консультации невролога) и лабораторных данных из архивных историй болезни больных с диагнозом острый КЭ за период с 2003 по 2017 гг.

Ретроспективно проведено изучение историй болезней, откуда получена информация об эпидемиологическом анамнезе, жалобах, объективном статусе и результатах лабораторных тестов (общеклинического и биохимического анализов крови, исследования спинномозговой жидкости для больных МФ, ОФ и ОФЛИ КЭ, а также серологических маркеров вируса КЭ). Во время госпитализации наличие признаков оценивались и регистрировались ежедневно, что позволило оценить продолжительность основных симптомов.

Вся полученная информация занесена в базу данных и включала: возраст, пол больного, фоновые соматические заболевания, 7 параметров эпидемиологического анамнеза, а именно, наличие или отсутствие достоверных сведений о присасывании или наползании клеща, количестве снятых с больного клещей, локализации присасывания клеща на теле, проведении экстренной профилактики антибиотиками против ИКБ и/или донорским иммуноглобулином человека против КЭ, данных о вакцинации против КЭ в анамнезе. Кроме того, в базу данных были внесены сведения о продолжительности инкубационного периода, параметры жалоб больного при поступлении в стационар (головная боль, головокружение, гиперестезия, тошнота, рвота, боли в мышцах, чувство онемения в конечностях), данные объективного статуса в день госпитализации, включая показания температуры тела, артериального давления, частоты пульса и дыхания и детализированные данные неврологического статуса (нарушение сознания, наличие судорожного синдрома, изменение речи, походки, пальценосовой пробы, устойчивости в позе Ромберга, нарушение функций черепных нервов, менингеальные симптомы, изменение объема движений, тонуса и силы мышц в конечностях, а также глубоких и поверхностных рефлексов). Анализировались 13 показателей биохимического и общеклинического анализов крови (глюкоза, аланин аминотрансфераза (АЛТ), аспартат аминотрансфераза (АСТ), общий билирубин, эритроциты, гемоглобин, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), лейкоциты, лимфоциты, моноциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы и эозинофилы), результаты бактериологического посева материала

из носоглотки на менингококк и условно-патогенные микроорганизмы, а также 6 показателей анализа ликвора (плеоцитоз, белок, глюкоза и хлориды).

Результаты большинства общеклинических лабораторных тестов оценивались при поступлении больных в стационар и в динамике через 7−10 дней. Все вышеперечисленные параметры в базе данных представлены как количественные или качественные показатели в виде единицы в случае наличия симптома (признака) или нуля при его отсутствии, что позволило сформировать группы, четко следуя критериям включения, избегая попадания в исследование больных с уже развившейся очаговой симптоматикой.

Дополнительно, помимо изучения клинических данных, проспективно, у 22 больных ЛФ, 23 больных МФ, 15 больных ОФ КЭ, а также 22 здоровых лиц (контрольная группа) взяты (таблица 2):

1) пробы клеток буккального эпителия для получения цитологических мазков с целью подсчета частоты клеток с микроядрами (МЯ);

2) образцы венозной крови для получения:

а) сыворотки крови с целью изучения концентрации одного из показателей ПОЛ– малонового диальдегида (МДА);

б) культуры мононуклеарных клеток с целью определения продукции цитокинов (ИФ-α, ИФ-γ, ФНО-α, ИЛ-4 и ИЛ-10) в супернатантах или с целью получения цитологических препаратов и подсчета частоты Т-лимфоцитов с МЯ.

Кроме того (таблица 2), у 53 больных ЛФ КЭ (включая 22 больных из числа выше упомянутых пациентов с ЛФ) и 57 лиц контрольной группы взяты пробы клеток буккального эпителия ротовой полости для:

1) выделения ДНК и определения активных и неактивных вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* в генотипе методом ПЦР;

2) получения цитологических мазков и подсчета частоты клеток с МЯ вдинамике при госпитализации в стационар, а также спустя 1 и 3 месяца

Таблица 2 – Методы исследования и численность групп

Методы исследования	ЛФ	МФ	ОФ	ОФЛИ	Контроль
Анализ данных анамнеза и объективного статуса	53	138	20	6	57
Общеклинические лабораторные тесты	33	54	20	6	—
Цитогенетический анализ бинуклеарных Т-лимфоцитов в культурах мононуклеарных клеток	22	23	15	—	22
Цитогенетический анализ клеток буккального эпителия	53	23	15	—	57
Анализ продукции цитокинов	22	23	15	—	22
МДА в сыворотке крови	22	23	15	—	22
Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1*	53	—	—	—	57

Примечание – Условные обозначения: МДА – малоновый диальдегид; КЭ – клещевой энцефалит; ЛФ – лихорадочная форма; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; ОФЛИ – очаговая форма с летальным исходом

Цитогенетические методы исследования и определение активных и неактивных вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* в генотипе методом ПЦР проведен на базах ФГБУН Институт экологии человека СО РАН (г. Кемерово) и ФГБУН НИИ медицинской генетики (г. Томск). Анализ спонтанной продукции цитокинов в супернатантах культур мононуклеарных клеток и определение концентрации МДА в сыворотке крови проводились на базе ЦНИЛ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Получение культур мононуклеарных клеток периферической крови

У обследованных лиц взято по 10 мл венозной крови для получения сыворотки и культур мононуклеарных клеток периферической крови. В качестве антикоагулянта в пробирки добавлен гепарин, за исключением метода определения в сыворотке крови МДА, когда использовали этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Для получения культур *in vitro* мононуклеарные клетки инкубировали во флаконах (около $1{,}0 \times 10^6$ клеток/мл) в среде RPMI-1640 («ПанЭко», г. Москва, РФ) с добавлением антибиотиков (100 мкг/мл гентамицина и 100 ЕД/мл ампициллина) при 37 °С в присутствии 5 % CO_2. Культуры мононуклеарных клеток использовались в дальнейшем для определения концентрации цитокинов в супернатантах или для получения препаратов бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов периферической крови.

2.2.2Цитогенетический анализ бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов в культурах мононуклеарных клеток периферической крови

Получение культур мононуклеарных клеток и анализ частоты бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов периферической крови с МЯ проводился в соответствии со стандартной методикой [88, 112, 173, 174]. Пробы гепаринизированной крови (0,3 мл) переносили в стерильные флаконы, содержащие 4,7 мл культуральной среды, состоящей из питательной среды RPMI-1640 («ПанЭко», г. Москва, РФ) с добавлением 10 % инактивированной стерильной эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma-Aldrich», США), 1 % раствора антибиотиков (10 000 МЕ/мл бензилпенициллина и 10 мг/мл стрептомицина) и 0,1 мл раствора фитогемагглютинина М (ФГА) в концентрации 10 мкг/мл в качестве стимулятора деления Т-лимфоцитов (ПанЭко, РФ). После

44 часов культивирования при 37 ^{o}C в присутствии 5 % CO_2 в культуру клеток добавляли 100 мкл цитокинез-блокирующий агента – цитохалазина В («Sigma-Aldrich», США) при концентрации раствора 300 мкг/мл и продолжали инкубировать еще 28 ч при 37 °С. Фиксацию клеток и приготовление препаратов начинали через 72 ч после начала инкубации. Клетки ресуспендировали во флаконах, выливали в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 10 мин при 1 000 оборотов/мин. Супернатант удаляли, и к осадку добавляли 5 мл 0,075М гипотоническогораствора калия хлорида. Флаконы выдерживали при комнатной температуре в течение 5 мин с целью разрушения эритроцитов. Для фиксации клеток использовали 0,5 мл свежеприготовленной смеси абсолютного этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 5 : 1. Суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 1 000 об./мин супернатант удаляли, осадок вновь ресуспендировали и дважды повторяли процедуру фиксации пока клеточная суспензия не станет чистой. После последней стадии центрифугирования большая часть супернатанта удалялась, оставляя объем, не превышающий 200 мкл. Полученную суспензию с помощью пипетки переносили на сухое предметное стекло и высушивали на воздухе в течение не менее 20 мин. Препараты окрашивали по методу Гимзе (2 % раствором Гимзе, содержащим азур, эозин и метиленовый синий) и анализировали не менее 1 000 бинуклеарных клеток у каждого человека для определения частоты встречаемости цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с МЯ. К основным критериям идентификации МЯ можно отнести следущие признаки: одинаковая структура и интенсивность окраски основных ядер и МЯ, диаметр МЯ варьировал от 1/16 до 1/3 диаметра одного из основных ядер, МЯ имели четкие границы и не соединены с основными ядрами.

2.2.3 Определение спонтанной продукции цитокинов в супернатантах культур мононуклеарных клеток периферической крови

Оценка спонтанных уровней продукции цитокинов (ИФ-α, ИФ-γ, ФНО-α, ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-10) в супернатантах (в пг/мл) проводилась в 24-часовых культурах мононуклеарных клеток (без добавления митогенов и 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки) периферической крови с помощью твердофазного ИФА в соответствии с инструкциями, предлагаемыми производителем тест-систем (ООО «Протеиновый контур», РФ). Оптическую плотность регистрировали с помощью иммунологического анализатора «Униплан» (ЗАО «Пикон», РФ) при длине волны 450 нм.

2.2.4 Определение малонового диальдегида в сыворотке крови

Содержание МДА (в мкмоль/л) в сыворотке крови (в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА) определяли флуориметрически согласно В.Б. Гаврилову с соавт. в реакции с тиобарбитуровой кислотой [8].

2.2.5 Цитогенетический анализ клеток буккального эпителия

Перед началом взятия материала для исследования каждый обследуемый должен дважды прополоскать рот водой. Для взятия образцов клеток буккального эпителия слизистой оболочки левой и правой щек использовали два отдельных одноразовых стерильных шпателя. Соскобы делали выше линии смыкания зубов. Полученные таким образом образцы буккальных клеток помещали в два контейнера, помеченных «левая щека» и «правая щека», которые содержали 10 мл фиксатора Саккоманно («Diapath», Италия). Суспензию клеток в фиксаторе центрифугировали в течение 10 мин при 1 000 об./мин. К осадку добавляли 5 мл буфферного раствора с pH 7,0, который готовили следующим образом: смесь, содержащую 1,6 г Трис-HCl, 38,0 г тетранатриевой соли ЭДТА и 1,2 г хлорида

натрия растворяли в 600 мл деионизированной воды, доводили конечный объем до 1 000 мл и стерилизовали в автоклаве. Полученную суспензию клеток центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость и в пробирку вновь добавляли 5 мл буфферного раствора. Клеточную суспензию гомогенизировали, снова центрифугировали и после удаления супернатанта к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 900 мкл буфферного раствора и 50 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки фиксировали с помощью смеси этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. С помощью пипетки по 100 мкл клеточной суспензии наносили на чистые и высушенные предметные стекла. Полученные препараты окрашивали по методу Фельгина. У каждого обследованного проанализировано не менее 1 000 буккальных клеток. Цитогенетический анализ частоты клеток буккального эпителия с МЯ проведен в соответствии со стандартной методикой [88, 173, 174,180]. Анализ препаратов осуществляли с помощью микроскопа «Primo Star iLED» (Carl Zeiss, Германия) при увеличении в 1 000 раз.

2.2.6Анализ полиморфизма генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1*

Делеционные варианты генов *GSTM1* (GenBank № X68676) и *GSTT1* (GenBank № AP000351) идентифицированы в мультиплексной ПЦР [71, 85]. ДНК выделяли из образцов клеток буккального эпителия согласно стандартному протоколу. В пробу вносили две пары праймеров, что давало возможность одновременно амплифицировать фрагменты каждого из указанных генов. В данной работе использовали амплификаторы «Терцик» («ДНК-Технология», РФ). Разделение продуктов амплификации и продуктов рестрикции ампликонов проводили в 3 % агарозном геле, приготовленном на однократном трис-боратном буфере с добавлением бромистого этидия и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете (длина волны 380 нм) с применением камеры для горизонтального электрофореза ЕС 12-13 («Биоком»),

РФ). Нормальные аллели генов, обозначенные знаком «+» характеризуются присутствием ПЦР-продуктов. Такие доноры могут быть либо гетерозиготны (*GSTM1* (+/0) и *GSTT1*(+/0)), либо гомозиготны (*GSTM1* (+/+) и *GSTT1*(+/+)) по нормальному активному аллелю. Мутантный генотип *GSTM1*(0/0) или *GSTT1*(0/0) означает отсутствие на электрофореграмме фрагментов размером 271 и 480 пар оснований, в результате чего данные индивидуумы гомозиготны по делеции и имеют резкое снижение активности соответствующего фермента [85].

2.2.7 Статистические методы

Для обработки данных и статистического анализа с применением U-критерия Манна – Уитни, *t*-критерия Стьюдента, коэффициента корреляции Спирмена и других критериев использовалось программное обеспечение STATISTICA 12.0 (StatSoft, США)[4]. Кроме того, мы использовали программы Epi Info, версия 3.3.2 (Центр контроля и профилактики заболеваний, США) для расчетов показателя отношения шансов (ОШ) и критерия значимости гипотезы χ^2.

Количественные данные проверяли на соответствие нормальному закону распределения с помощью критерия Колмогорова − Смирнова. Для определения статистической значимости различий независимых выборок количественных переменных применяли непараметрический U-критерий Манна – Уитни или *t*-критерий Стьюдента в случае нормального распределения данных. Кроме того, применялся параметрический критерий Стьюдента для зависимых выборок и непараметрический критерий Вилкоксона для парных сравнений [9]. Для определения существования корреляционной связи между параметрами вычисляли ранговую корреляцию Спирмена [9].

Различия качественных данных между группами проанализированы с помощью критерия значимости гипотезы χ^2 с поправкой Йейтса или точного критерия Фишера, а также коэффициента взаимной сопряженности (К) [9, 35].

Данные представлены как медиана (*Me*) и первый и третий квартили – [*Q0,25* ; *Q0,75*], отношение шансов(ОШ) и 95% доверительные интервалы

(95 %ДИ) или как $\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$, где $\bar{X}$ – выборочное среднее, а $s_{\bar{x}}$ – стандартная ошибка. Кроме того, некоторые результаты представлены как $p \pm S_p$, где p – выборочная доля, а S_p– стандартная ошибка выборочной доли [9, 35]. При проверке статистических гипотез двусторонние значения $P < 0{,}05$ интерпретированы как статистически значимые.

С помощью специализированных модулей приложения Scorecard программного обеспечения STATISTICA 12.0 (StatSoft, США) [162, 166] предназначенных для разработки и оценки моделей, созданы алгоритмы, позволяющие прогнозировать риск ОФ и МФ КЭ в ранний период болезни. Вначале были созданы расширенные модели, включающие данные всех, проанализированных параметров. Затем с помощью модуля, определяющего информационную ценность каждого показателя, была дана оценка их прогностической силы и исключены все несущественные или избыточные переменные из первоначального набора параметров. В модуле анализа качественной переменной подготовлены профили рисков и весовые коэффициенты доказательности для каждого показателя. На основе результатов анализа качественной переменной и бинарной логистической регрессии в модуле Scorecard созданы оценочная система и сгенерирована шкала в баллах для каждой модели [162, 166]. Известно, что бинарный логистический регрессионный анализ исследует связь между набором независимых переменных и зависимой переменной, в качестве которой в данной работе послужили клинические формы КЭ: для ОФ было выбрано значение 1, а для МФ использовано значение 0. Прогностическая оценка диагностических моделей проведена с помощью последовательного статистического анализа Вальда и ROC-анализа (от англ. receiver operating characteristic) в координатах графиков «чувствительность–специфичность» с вычислением AUC (от англ. area under ROC curve) – площади под ROC-кривой и COV (от англ. cut-off value) – значения оптимального порога отсечения переменной [111]. Кроме того, использованы стандартные критерии точности бинарных диагностических тестов (чувствительность, специфичность, отрицательные и положительные

прогностические значения). Для оценки качества прогноза как отдельных изученных параметров, так и разработанных моделей использовалось определение площади под ROC-кривой AUC (варьирует в пределах 0–1). Среди клинических параметров выполнен поиск наиболее информативных предикторов прогнозирования ОФ КЭ. Во внимание принимались показатели со «средним» (AUC > 0,6), «хорошим» (AUC > 0,7), «очень хорошим» (AUC > 0,8) и «отличным» качеством прогнозирования (AUC > 0,9) [111]. Для каждой модели проведен расчет COV оптимальных порогов отсечения в баллах с учетом значений чувствительности и специфичности, которые соответствуют границам между интервалами показателей и позволяют достоверно разделить ОФ и МФ КЭ.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Клинико-лабораторные прогностические критерии очаговой формы острого клещевого энцефалита

3.1.1 Эпидемиологические и анамнестические предикторы очаговой формы клещевого энцефалита

Мы проанализировали эпидемиологические и анамнестические данные у 138 больных с подтвержденным диагнозом менингеальной формы (МФ), 20 пациентов с очаговой формой (ОФ) с благоприятным исходом острого КЭ, а также у 6 больных ОФ с летальным исходом (ОФЛИ). В таблице 3 представлены эпидемиологические и анамнестические параметры, которые имели статистически значимые отличия между группами больных с ОФ и МФ КЭ. В таблице показаны результаты изучения показателя отношения шансов (ОШ) для каждого параметра, которые показывают во сколько раз шанс иметь изучаемый признак в группе больных ОФ больше, чем в группе МФ КЭ.

Показано, что различные фоновые заболевания отмечались у (39,1 ± 48,8) % больных МФ КЭ, у (65,0 ± 47,7) % пациентов с ОФ ($P < 0,001$) и у (83,3 ± 37,3) % больных ОФЛИ ($P < 0,001$). Анализ структуры фоновой патологии позволил установить, что у больных МФ наиболее часто встречались: хроническое нарушение мозгового кровообращения (6,5 %), хронический алкоголизм (5,8 %), гипертоническая болезнь (ГБ) (5,8 %), хронический вирусный и/или токсический гепатит (5,1 %), сахарный диабет преимущественно 2-го типа (3,6 %), ожирение (2,9 %) и ишемическая болезнь сердца (ИБС) (3,6 %). У больных ОФ КЭ в качестве фоновой патологии зарегистрированы: ГБ (40,0 %), хроническое нарушение мозгового кровообращения (10,0 %), хронический вирусный и/или токсический гепатит (10,0 %), сахарный диабет (35,0 %), ИБС (25,0 %) и ожирение (15,0 %).

Таблица 3 – Эпидемиологические и анамнестические предикторы очаговой формы клещевого энцефалита

Предикторы	Частота (%) в группах больных КЭ		ОШ (95 %ДИ)	χ^2	*P*
	ОФ n = 20	МФ n = 138			
Эпиданамнез:					
Возраст > 41года	65,0	27,5	4,9 (2,0 − 12,1)	14,1	< 0,001
Возраст > 69лет	25,0	3,6	8,8 (2,2 − 34,2)	13,5	< 0,001
Локализация присасывания клеща в области головы и шеи	35,0	3,6	14,3 (3,9 − 51,6)	24,5	< 0,001
День поступления в стационар от начала болезни, >7 дней	60,0	23,9	4,3 (1,8 − 10,4)	12,1	< 0,001
Фоновые заболевания:					
Число заболеваний ≥ 2	70,0	3,6	59,2(17,3 − 210,6)	77,2	< 0,001
Сахарный диабет	35,0	3,6	14,3 (3,9 − 51,6)	24,5	< 0,001
Гипертоническая болезнь	40,0	5,8	8,6 (2,9 − 25,3)	19,6	< 0,001
Ишемическая болезнь сердца	25,0	3,6	8,8 (2,2 − 34,2)	13,5	< 0,001
Ожирение, 1-2 ст.	15,0	2,9	6,1 (1,4 − 26,1)	6,0	0,01

Примечание– Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; ОШ – отношение шансов; 95% ДИ – 95% доверительный интервал; χ^2– критерий «хи-квадрат»; *P*– значимость различий

Установлено, что сахарный диабет регистрировался у 83,3 ± 37,3 % больных ОФЛИ, у 35,0 ± 47,6 % больных ОФ без летального исхода и только у 3,6 ± 18,6 % больных с МФ (при сравнении групп МФ и ОФ с группой ОФЛИ, а также ОФ с ОФЛИ, $P < 0{,}001$ во всех случаях).

Гипертоническая болезнь и ИБС диагностированы у 5,8 ± 23,4 % и 3,6 ± 18,6 % пациентов с МФ, у 40,0 ± 48,9 % и 25,0 ± 43,3 % больных ОФ без летального исхода и у 83,3 ± 37,3 % и 83,3 ± 37,3 % умерших больных с ОФ соответственно ($P < 0,001$ во всех случаях). Кроме того, ожирение встречалось у 2,9 ± 16,8 % больных с МФ, 15,0 ± 35,7 % выживших больных ОФ и у 50,0 ± 50,0 % больных ОФЛИ ($P < 0,001$ во всех случаях).

Можно считать установленным наличие связи между вероятностью развития ОФ КЭ и такими фоновыми заболеваниями как сахарный диабет 2-го типа (ОШ = 14,3 (3,9 – 51,6), $\chi^2 = 24,5$, $P < 0,001$), ГБ (ОШ = 8,6 (2,9 – 25,3), $\chi^2 = 19,6$, $P<0,001$), ИБС (ОШ = 8,8 (2,2 – 34,2), $\chi^2 = 13,5$, $P < 0,001$) и ожирение (ОШ = 6,1 (1,4 – 26,1), $\chi^2 = 6,0$, $P = 0,01$). Показано, что в группах больных ОФ и ОФЛИ статистически значимо чаще встречались одновременно несколько различных фоновых заболеваний (два и более) у одного пациента (70,0 ± 45,8) % и (83,3 ± 37,3) %, по сравнению с группой больных с МФ КЭ, где этот показатель не превышал (3,6 ± 18,6 %, $P < 0,001$), что, по-видимому, говорит о зависимости между тяжестью течения КЭ и наличием фоновых соматических заболеваний. Об этом также свидетельствуют результаты корреляционного анализа с использованием коэффициента взаимной сопряженности (К), который позволил выявить зависимость между числом фоновых заболеваний у больного КЭ (все группы больных проанализированы вместе) и степенью выраженности нарушения сознания: ясное, оглушение, сопор, делирий или кома (К = 0,64, Р < 0,001).

Кроме того, установлена зависимость между вероятностью развития ОФ и возрастом больных старше 41 года (ОШ = 4,9 (2,0 – 12,1), $\chi^2 = 14,1$, $P < 0,001$). С увеличением возраста больного КЭ (более 69 лет) вероятность развития ОФ также оставалась значительно выше, чем МФ (ОШ = 8,8 (2,2 – 34,2), $\chi^2 = 13,5$, $P < 0,001$).

Анализ локализации укуса клеща на теле больных КЭ (голова, грудная клетка, живот, верхние или нижние конечности), показал, что вероятность развития ОФ в случае присасывания клеща в области головы и шеи (по

сравнению со всеми другими локализациями присасываний) выше, чем МФ КЭ (ОШ = 14,3 (3,9 – 51,6), $\chi^2 = 24,5$, $P < 0,001$). Кроме того, установлено, что ОФ чаще развивались, по сравнению с МФ КЭ, в случае относительно позднего поступления больного в стационар – в срок более 7 дней от начала заболевания (ОШ = 4,3 (1,8 – 10,4), $\chi^2 = 12,1$, $P < 0,001$).При этом надо подчеркнуть, что в исследование включены больные, поступившие в срок первой недели от начала заболевания, с условием отсутствия очаговой симптоматики.

Таким образом, установлено, что к числу эпидемиологических и анамнестических параметров, имеющих прогностическое значение для развития ОФ КЭ можно отнести возраст больного старше 41 года, локализацию присасывания клеща в области головы и шеи, срок поступления больного в стационар более 7 дней от начала заболевания, число фоновых соматических заболеваний у пациента 2 и более, а также наличие таких патологий как сахарный диабет (преимущественно 2-го типа), ГБ, ИБС и ожирение.

3.1.2 Клинические предикторы очаговой формы клещевого энцефалита

Мы проанализировали 40 параметров жалоб, объективного статуса у 138 больных с МФ, 20 больных ОФ КЭ. Дополнительно изучалась продолжительность (в днях) большинства проанализированных симптомов у каждого больного МФ и ОФ КЭ.

В таблице 4 представлены основные данные объективного статуса, которые имели статистически значимые отличия между группами больных с ОФ и МФ КЭ. Установлены статистически значимые связи между вероятностью развития ОФ КЭ и показателями систолического и диастолического давления выше 140 и 90 мм рт. ст. соответственно ($\chi^2 = 19,9$, $P < 0,001$, $\chi^2 = 28,5$, $P < 0,001$), частоты пульса выше 90 в мин ($\chi^2 = 54,4$, $P < 0,001$), частоты дыхательных движений более 20 в мин ($\chi^2 = 9,0$, $P = 0,003$), а также повышения температуры тела в первые дни болезни выше 39,5^{o}C ($\chi^2 = 14,9$, $P < 0,001$).

Таблица 4 – Параметры объективного статуса, имеющие прогностическое значение для развития очаговой формы клещевого энцефалита в начальном периоде заболевания

Предикторы	Частота (%) в группах больных КЭ		ОШ (95%ДИ)	χ^2	*P*
	ОФ n=20	МФ n=138			
СД, > 140 мм рт. ст.	40,0	7,2	8,0 (2,9 – 22,2)	19,9	< 0,001
ДД, >90 мм рт. ст.	45,0	5,8	11,9 (4,1 – 34,3)	28,5	< 0,001
Частота пульса, >90 в мин	60,0	5,8	26,0 (8,9 – 75,4)	54,4	< 0,001
ЧД, > 20 в мин	50,0	21,7	3,6 (1,5 – 8,6)	9,0	0,003
Температура тела, ≥ 39,5°С	45,0	13,8	5,4 (2,2 – 13,3)	14,9	< 0,001
Оглушенность	85,0	13,0	36,7 (11,3 – 118,7)	56,9	< 0,001
Дезориентация	50,0	5,8	16,3 (5,7 – 46,4)	38,3	< 0,001
Спутанная речь	75,0	3,5	88,7 (24,7 – 317,8)	90,9	< 0,001
Рвота	80,0	29,7	9,9 (3,5 – 28,2)	24,3	< 0,001
Грубая ригидность затылочных мышц	80,0	46,3	4,9 (1,7 – 13,6)	10,4	0,001
Симптом Кернига	75,0	26,1	7,7 (2,9 – 19,8)	21,7	< 0,001
Симптомы Брудзинского	45,0	20,3	3,4 (1,4 – 8,1)	7,9	0,005

Примечание: – Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; СД – систолическое давление; ДД – диастолическое давление; ЧД – частота дыхания; ОШ – отношение шансов; 95 % ДИ – 95 % доверительный интервал; χ^2 – критерий «хи-квадрат»; *P* – значимость различий

Кроме того, проанализирована последовательность появления наиболее ранних неврологических симптомов, которые встречались как при тяжелой МФ, так и предшествовали очаговой симптоматике в случае ОФ. Показано, что в качестве прогностических критериев высокого риска развития ОФ КЭ, по сравнению с тяжелым течением МФ, в ранние сроки болезни следует обращать

особое внимание на появление хотя бы одного из следующих симптомов: дезориентации (в дальнейшем у таких пациентов часто развивался делириозный синдром) (χ^2 = 38,3, P < 0,001), оглушенности (χ^2 = 56,9, P < 0,001) и спутанной речи (χ^2 = 90,9, P < 0,001). Кроме того, у больных ОФ с менингоэнцефалитом значительно чаще, чем у пациентов с МФ КЭ выявлялись положительные симптомы Кернига (χ^2 = 21,7, P < 0,001), Брудзинского (χ^2 = 7,9, P = 0,005), грубая ригидность затылочных мышц (χ^2 = 10,4, P < 0,001) и рвота (χ^2 = 24,3, P < 0,001).

Дополнительно изучены продолжительность основных симптомов у больных ОФ и МФ КЭ. Установлено, что у больных ОФ КЭ чаще, по сравнению с пациентами МФ, отмечалась продолжительность таких симптомов, как лихорадка (включая субфебрилитет) более 10 дней (χ^2 = 12,1, P < 0,001), боли в спине более 9 дней (χ^2 = 8,9, P = 0,003), тошнота, головная боль свыше 7 дней (χ^2 = 6,5, P = 0,011, χ^2 = 7,2, P = 0,008), чувство онемения конечности и нарушение зрения в виде диплопии или мелькания «мушек» более 10 дней (χ^2 = 15,9, P < 0,001, χ^2 = 7,4, P = 0,007), миалгия более 11 дней (χ^2 = 9,8, P = 0,002).

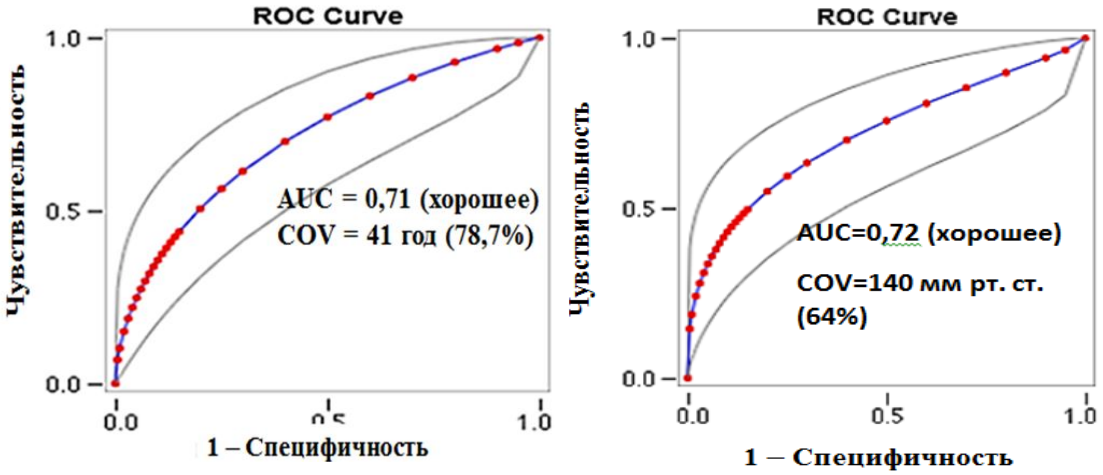
Следует отметить, что у больных с тяжелым течением МФ в отличие от больных ОФ вышеперечисленные неврологические симптомы имели кратковременный и преходящий характер. В частности, показано, что пациенты с ОФ заболевания, по сравнению с МФ, значимо чаще имеют продолжительность дезориентации более 2 дней (χ^2 = 15,9, P < 0,001), менингеальных симптомов более 10 дней (χ^2 = 22,8, P < 0,001) и нарушения координации движений более 5 дней (χ^2 = 32,2, P < 0,001).

В таблице 5 и на рисунках 1 и 2 приведены результаты ROC-анализа с помощью определения AUC (от англ. area under ROC curve – величины площади под кривой) и COV (от англ. cut-off value – значения оптимального порога отсечения) с оценкой чувствительности и специфичности изученных количественных показателей в качестве предикторов ОФ КЭ.

Таблица 5 – Чувствительность и специфичность клинических предикторов очаговой формы клещевого энцефалита

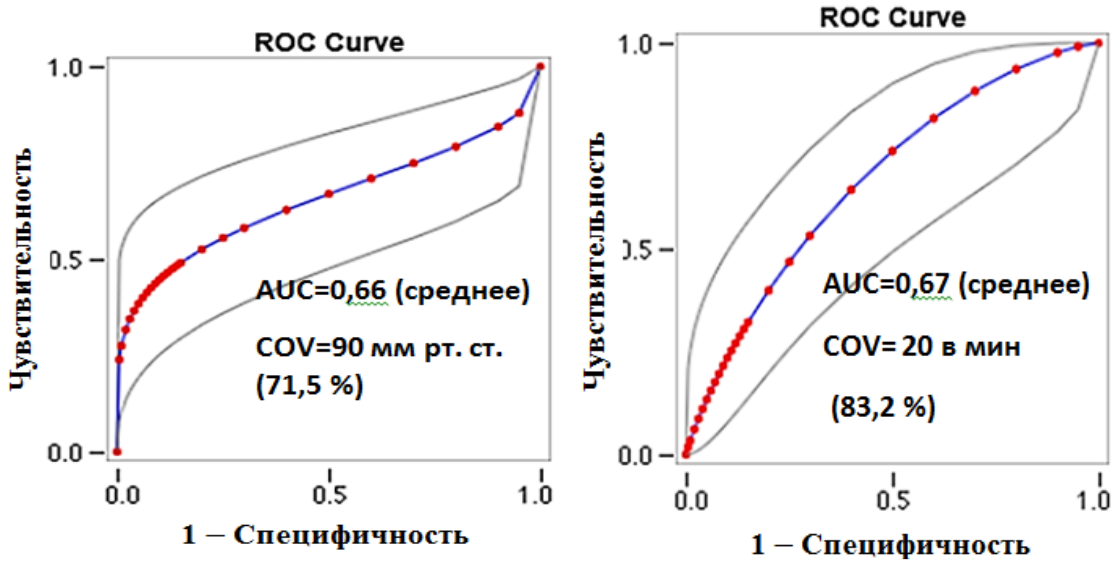
Предикторы	AUC / Качество прогноза	COV	Вероятность ОФ при значениях выше COV, %
Возраст, в годах	0,71 / хорошее	41	78,7
СД, мм рт. ст.	0,72 / хорошее	140	64,0
ДД, мм рт. ст.	0,66 / среднее	90	71,5
Частота пульса, в мин	0,63 / среднее	90	74,1
Частота дыхания, в мин	0,67 / среднее	20	83,2
Температура тела,^{o} С	0,62 / среднее	39,5	63,3

Примечание – Условные обозначения: ROC-анализ (receiver operating characteristic); AUC (area under ROC curve) – площадь под ROC-кривой; COV (cut-off value) – значение оптимального порога отсечения; ОФ – очаговая форма; СД – систолическое давление; ДД – диастолическое давление



а *б*

Рисунок 1 – Результаты ROC-анализа клинических показателей, имеющих прогностическое значение для диагноза очаговой формы (положительные случаи), по сравнению с менингеальной формой (отрицательные случаи), клещевого энцефалита: *а*– возраст (COV=41 год, AUC=0,71); *б*– систолическое давление (COV=140 мм рт. ст., AUC=0,72)



а *б*

Рисунок 2 – Результаты ROC-анализа клинических показателей, имеющих прогностическое значение для диагноза очаговой формы (положительные случаи), по сравнению с менингеальной формой (отрицательные случаи),клещевого энцефалита: *а*– диастолическое давление (COV= 90 мм рт. ст., AUC=0,66); *б*– частота дыхания (COV= 20 в мин, AUC=0,67)

COV являются критическими значениями каждого показателя, которые разделяют анализируемый массив данных на две части с альтернативным прогнозом, одна из которых соответствует значениям этого показателя, доминирующим у больных МФ, а другая – у больных ОФ КЭ. Установлено, что в начальном периоде болезни «хорошее» качество прогноза высокого риска развития ОФ имели (таблица 5, рисунки 1 и 2): возраст больного более 41 года (AUC = 0,71) и систолическое давление выше 140 мм рт. ст. (AUC = 0,72); «среднее» качество продемонстрировали такие предикторы как диастолическое давление более 90 мм рт. ст. (AUC = 0,66), частота пульса более 90 в мин (AUC = 0,63), частота дыхательных движений более 20 в мин (AUC = 0,67), а также повышение температуры тела выше или равно 39,5 ^{o} С (AUC = 0,62).

3.1.3 Модели прогноза очаговой и менингеальной форм клещевого энцефалита для формирования групп риска, разработанные на основе анализа клинико-эпидемиологических данных

Для формирования групп риска ОФ или МФ в начальный период КЭ построены несколько прогностических моделей на основе анализа клинико-эпидемиологических данных. Известно, что с помощью метода бинарной логистической регрессии можно исследовать зависимость дихотомических переменных от независимых переменных, имеющих любой вид шкалы. Бинарная логистическая регрессия в таком случае рассчитывает вероятность наступления события – положительного случая (вероятность ОФ КЭ) или отсутствие события – отрицательного случая (вероятность МФ КЭ) в зависимости от значений независимых переменных (изученных показателей). Прогностический риск наступления события P (X) рассчитывается по формуле:

$$P(X) = \frac{1}{1+e^{-z}},$$

где $z = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \cdots \beta_i X_i$,

где α– константа;

β_i – коэффициенты регрессии, рассчитанные в результате логистического регрессионного анализа;

X_i – значения независимых переменных.

В таблице 6 приведены результаты логистического регрессионного анализа создания диагностической модели 1. В модели 1 использовались такие параметры как возраст больного, частота пульса, число дней, прошедших от начала заболевания до поступления больного в стационар, а также наличие признаков дезориентации (возбуждения). Модель 1 имеет «отличное» качество прогноза развития ОФ и МФ КЭ (AUC = 0,96, при стандартной ошибке среднего (*S*) ± 0,02). Для каждого показателя в таблице приведены коэффициенты регрессии (β) и

указана условная шкала, которая позволяет рассчитать сумму баллов всех включенных в модель параметров для каждого пациента.

Таблица 6 – Модель 1 прогноза очаговой и менингеальной форм клещевого энцефалита для формирования групп риска в первую неделю заболевания на основе анализа клинико-эпидемиологических данных

Предикторы	Баллы	α /β (95 % ДИ)	Log-вероятность	χ^2	*P*
Модель 1		α = −1,62	−43,2		0,004
Возраст, в годах		β = 0,009 (0,001 – 0,018)	−35,6	15,1	< 0,001
< 20	164				
20−22	151				
22−27	136				
27−32	156				
32−35	164				
35−41	156				
42−49	99				
49−53	133				
53−69	99				
> 69	75				

Продолжение таблицы 6

Предикторы	Баллы	α/β (95 % ДИ)	Log-вероятность	χ^2	*P*
День поступления от начала болезни < 3 3−4 4−5 5−6 6−7 >7	 108 153 193 133 110 97	β = 0,017 (0,004 – 0,023)	−22,9	10,8	0,001
Пульс, в мин < 64 65−71 72−80 81−92 > 92	 113 130 133 47 26	β = 0,014 (0,004 – 0,024)	−28,3	14,6	< 0,001
Дезориентация • Нет • Возбуждение	 165 102	β = 1,1 (0,15 – 2,0)	−20,1	5,6	0,017
Примечание – Условные обозначения: α – константа регрессии; β – коэффициент регрессии; 95 %ДИ – 95 % доверительный интервал; χ^2– критерий «хи-квадрат»; *P*– значимость различий					

Показано, что при сумме баллов равной 478 или в интервале 405−478 чувствительность составит 85,0 %, специфичность – 96,3 %, а отрицательные и положительные прогностические значения – 0,95 и 0,89 (рисунок 3). Это означает, что если порог отсечения COV варьирует между 405 и 478, то вероятность диагноза ОФ составит 85 %, а вероятность МФ КЭ не более 3,7 % (рисунки 3 и 4).

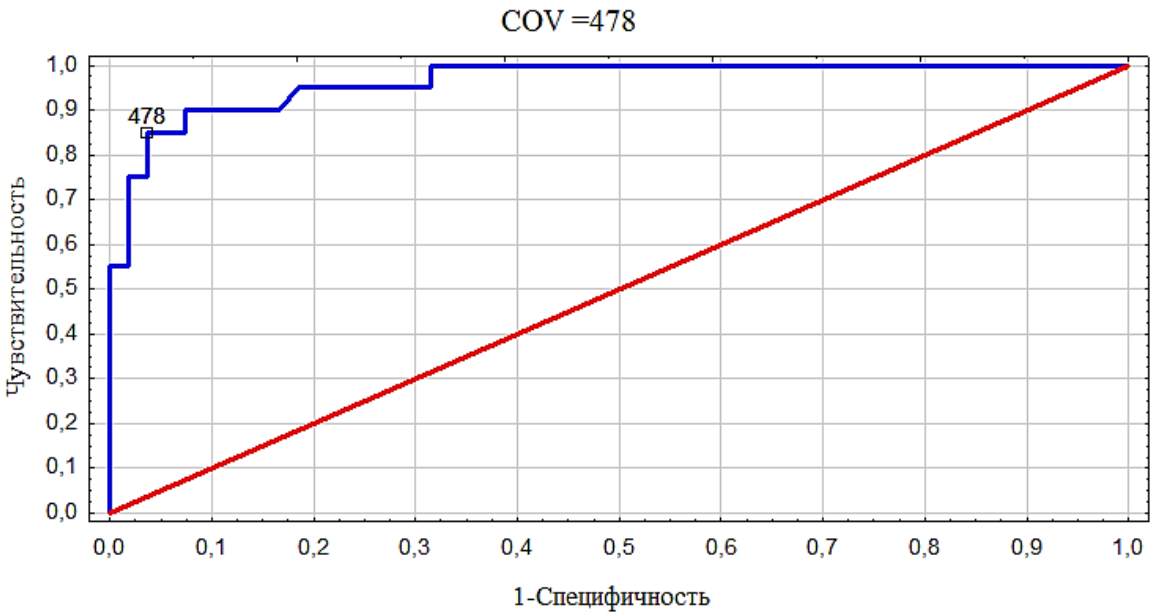


Рисунок 3 – Результаты ROC-анализа модели 1 прогноза очаговой (положительные случаи) и менингеальной форм (отрицательные случаи) клещевого энцефалита на основе анализа клинико-эпидемиологических данных (COV = 478, AUC = 0,96 ± 0,02, P < 0,001)

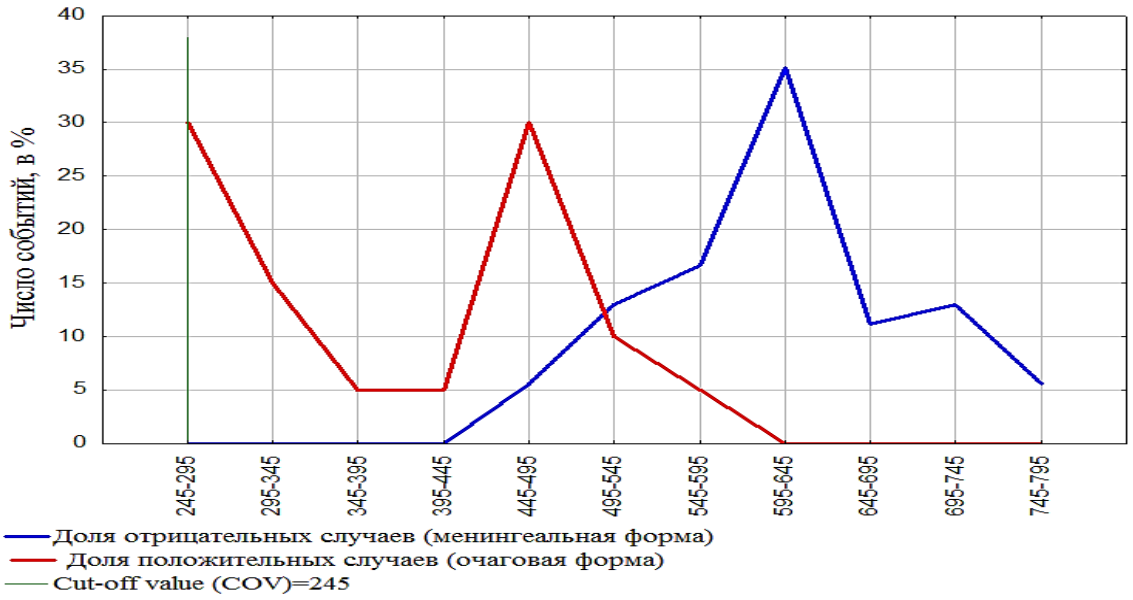


Рисунок 4 – Информативность модели 1 прогноза очаговой (положительные случаи) и менингеальной форм (отрицательные случаи) клещевого энцефалита на основе анализа клинико-эпидемиологических данных (COV = 478, AUC = 0,96 ± 0,02, P < 0,001). Ось *x* – интервалы в условных баллах; ось *y* – число событий (случаев очаговой или менингеальной форм в %)

В случае получения суммы баллов ниже 405 (рисунок 4) вероятность развития МФ равна нулю, а ОФ – более 85 % (отрицательные и положительные прогностические значения – 0,86 и 1,0). Если сумма баллов варьирует в интервале 478–595, то вероятность ОФ снижается от 85 % до нуля, а вероятность МФ напротив возрастает до 40,7 % (так называемая, «серая» зона, где шансы развития ОФ и МФ равновероятны). Если порог отсечения COV достигнет более 595 баллов, то вероятность МФ составит выше 40,7 %, а вероятность ОФ снизится до нуля (чувствительность равна 100 %, специфичность – 59,3 %, а отрицательные и положительные прогностические значения – 1,0 и 0,47).

В таблице 7 приведены результаты логистического регрессионного анализа и балльная шкала для прогностической модели 2 риска МФ и ОФ КЭ, основанной на данных объективного статуса в ранние сроки заболевания. Модель 2 включает такие параметры как сознание, речь и наличие рвоты.

Таблица 7 – Модель 2 прогноза очаговой и менингеальной форм клещевого энцефалита для формирования групп риска в первую неделю заболевания на основе анализа данных объективного статуса

Предикторы	Баллы	α/β (95 % ДИ)	Log-вероятность	χ^2	*P*
Модель 2		α = −18,85	−43,2		< 0,001
Сознание • Ясное • Оглушенность • Сопор • Делирий • Кома	 569 517 −596 −566 −566	β = 20,4 (17,2 – 23,5)	−11,9	34,6	< 0,001
Речь • Норма • Спутанная • Отсутствие	 532 −27 −562	β = 19,1	−9,0	5,9	0,015

Продолжение таблицы 7

Предикторы	Баллы	α/β (95 % ДИ)	Log-вероятность	χ^2	*P*
Рвота • Нет • Есть	 −3 −35	β = 0,6	−29,3	27,8	< 0,001
Примечание – Условные обозначения: α – константа регрессии; β – коэффициент регрессии; 95 %ДИ – 95 % доверительный интервал; χ^2– критерий «хи-квадрат»; *P*– значимость различий					

Модель имеет «отличное» качество прогноза развития ОФ и МФ КЭ (AUC = 0,98 при стандартной ошибке среднего (*S*) ± 0,02). Показано (рисунок 5), что при сумме баллов (COV) равной минус 67 баллов (или находящейся в интервале от минус 1 123 до минус 67) для прогноза ОФ чувствительность составит 85,0 %, а специфичность – 98,1 % (вероятность ОФ составит 85 %, а вероятность МФ только 1,85 %). В случае получения суммы баллов (COV) ниже минус 1 123 вероятность развития МФ равна нулю, а ОФ – более 85 %. Если сумма баллов варьирует в интервале от минус 67 до 750 баллов для модели 2, то вероятность ОФ снижается от 85 % до 0, а вероятность МФ, напротив, постепенно возрастает до 100 % (так называемая, «серая» зона, где шансы развития ОФ и МФ равновероятны). Если COV достигнет более 750 баллов, то вероятность МФ составит 100 %, а вероятность ОФ снизится до нуля (рисунок 6).

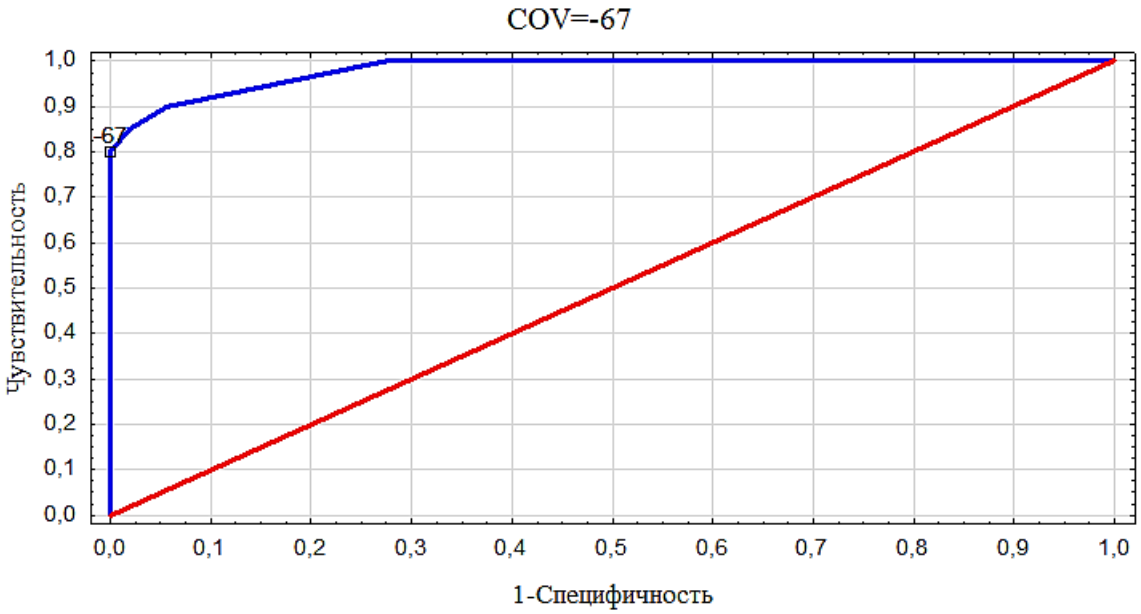


Рисунок 5 – Результаты ROC-анализа модели 2 прогноза очаговой (положительные случаи) и менингеальной форм (отрицательные случаи) клещевого энцефалита на основе анализа данных объективного статуса (COV = −67 баллов, AUC = 0,98 ± 0,02, P < 0,001)

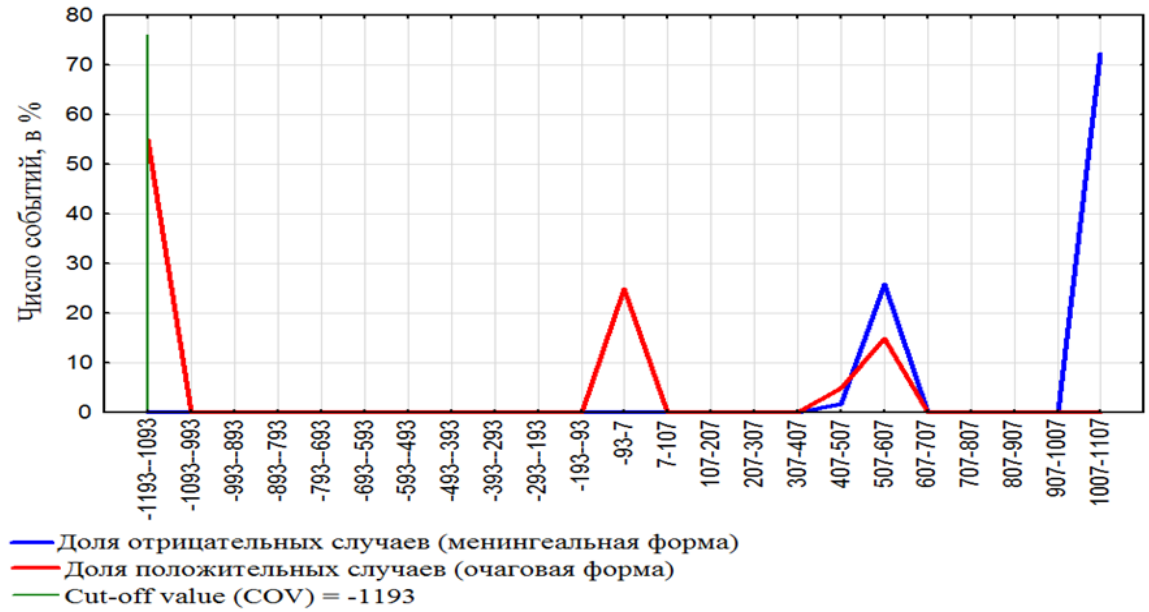


Рисунок 6 – Информативность модели 2 прогноза очаговой (положительные случаи) и менингеальной форм (отрицательные случаи) клещевого энцефалита на основе анализа данных объективного статуса (COV = −67 баллов, AUC = 0,98 ± 0,02, P < 0,001). Ось *x* – интервалы в условных баллах; ось *y* – число событий (случаев очаговой или менингеальной форм в %)

Следует подчеркнуть, что разработанные прогностические модели потенциально могут быть использованы практическими врачами при поступлении больного КЭ в стационар для формирования групп повышенного риска ОФ. Эти модели не предназначены для определения клинической формы, тяжести течения заболевания или рисков его исхода.

Проведенное исследование позволило идентифицировать наиболее информативные клинико-эпидемиологические прогностические критерии повышенного риска ОФ КЭ в ранние сроки болезни. К ним можно отнести следующие параметры: возраст больного старше 41 года, локализацию присасывания клеща в области головы и шеи, поступление в стационар после 7 дня от начала лихорадки, наличие более двух фоновых соматических заболеваний, в особенности сахарного диабета, ГБ, ИБС и ожирения, частоту пульса более 90 в мин, частоту дыхания более 20 в мин, показатели систолического и диастолического давления более 140 и 90 мм рт. ст. соответственно, повышение температуры тела более 39,5^{o}C; появление оглушенности, дезориентации, спутанной речи, рвоты, грубой ригидности затылочных мышц, симптомов Кернига и Брудзинского.

3.1.4 Общеклинические лабораторные предикторы очаговой формы клещевого энцефалита

Мы проанализировали некоторые показатели биохимического и общеклинического анализов крови, полученные из историй болезней 54 больных МФ, 20 больных ОФ с благоприятным исходом острого КЭ, а также у 6 больных ОФ с летальным исходом (ОФЛИ). Кроме того, при изучении данных биохимического и общеклинического анализов крови в качестве группы сравнения использованы данные 33-х больных лихорадочной формой (ЛФ) КЭ.

В таблице 8 приведены результаты изучения данных общеклинического анализа крови у больных с различными клиническими формами КЭ.

Таблица 8 – Результаты общеклинического анализа крови у больных различными клиническими формами острого клещевого энцефалита, *Me* [$Q_{0,25}$;$Q_{0,75}$]

Показатели	Клинические формы КЭ			
	ЛФ n = 33	МФ n = 54	ОФ n = 20	ОФЛИ n = 6
Лейкоциты, $\times 10^9$/л	6,5 [5,5;7,8]	10,2 [8,3;11,9] P_1 < 0,001	11,5 [7,6;13,8] P_1<0,001 P_2=0,33	11,7 [8,1;17,6] P_1 < 0,001 P_2 = 0,057 P_3 = 0,53
Палочкоядерные нейтрофилы,%	0 [0;0,75]	3,0 [2,0;4,0] P_1 = 0,019	2,0 [1,0;7,0] P_1 < 0,001 P_2 = 0,42	2,0 [2,0;12,0] P_1 < 0,001 P_2 = 0,031 P_3 = 0,36
Сегментоядерные нейтрофилы,%	56,0 [48,7;71,3]	69,0 [62,0;73,0] P_1 = 0,003	77,5 [60,0;84,0] P_1 =0,001 P_2 = 0,63	68,0 [64,0;69,0] P_1 = 0,041 P_2 = 0,61 P_3 = 0,38
Лимфоциты,%	33,7 [21,0;41,0]	20,0 [15,0;23,0] P_1<0,001	11,0 [8,0;26,0] P_1<0,001 P_2=0,41	15,0 [12,0;23,0] P_1 < 0,001 P_2 = 0,72 P_3 = 0,95

Продолжение таблицы 8

Показатели	Клинические формы КЭ			
	ЛФ n = 33	МФ n = 54	ОФ n = 20	ОФЛИ n = 6
СОЭ, мм/час	10,0 [6,8;16,7]	14,5 [9,0;20,0] P_1 = 0,003	13,0 [8,0;24,0] P_1 = 0,001 P_2 = 0,31	17,0 [8,0;26,0] P_1 = 0,001 P_2 = 0,27 P_3 = 0,57

Примечание – Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; ЛФ – лихорадочная форма; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; ОФЛИ – очаговая форма с летальным исходом; СОЭ – скорость оседания эритроцитов; *Me* – медиана; $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$ – квартили; n – численность группы; P_1– значимость различий значений показателя у больных МФ, ОФ или ОФЛИ от больных ЛФ; P_2– значимость различий значений показателя у больных ОФ или ОФЛИ от больных МФ; P_3– значимость различий значений показателя между группами больных ОФ и ОФЛИ

Установлено, что значения показателя числа лейкоцитов у больных ОФ, ОФЛИ или МФ КЭ значимо выше, чем у больных ЛФ ($P < 0,001$ во всех случаях). Относительное число палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов у пациентов с ОФ, ОФЛИ или у больных МФ также выше, по сравнению с больными ЛФ ($P < 0,001$, $P < 0,001$ и $P = 0,019$; $P = 0,001$, $P = 0,001$ и $P = 0,003$ соответственно). В тоже время, относительное число лимфоцитов в периферической крови у больных ОФ, ОФЛИ, или МФ оказалось значительно ниже, по сравнению с соответствующими значениями этого показателя у больных ЛФ ($P < 0,001$ во всех случаях). Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) как у больных ОФ и ОФЛИ, так и у пациентов с МФ выше, чем у больных ЛФ КЭ ($P = 0,001$, $P = 0,001$ и $P = 0,003$). Отмечено, что, число моноцитов и эозинофилов, а также концентрации гемоглобина и число эритроцитов в периферической крови не имели статистически значимых различий между этими группами больных ($P > 0,05$).

Дополнительно мы изучили основные показатели общеклинического анализа крови в динамике при поступлении в стационар и спустя 7−10 дней после этого. Установлено, что число лейкоцитов в крови больных МФ имело четко выраженную тенденцию к снижению при анализе этого показателя в динамике (10,2 [8,3;11,9] vs. 7,6 [6,0;9,4] $\times 10^9$/л, $P < 0{,}001$), в то же время у больных ОФ этот параметр с течением времени не имел статистически значимых отличий (11,5 [7,6;13,8] vs. 8,7 [7,0;12,4] $\times 10^9$/л, $P = 0{,}48$), а в группе пациентов с ОФЛИ, напротив, увеличивался при повторных исследованиях (11,7 [8,1;17,6] vs. 24,7 [19,0;26,0]$\times 10^9$/л, $P = 0{,}028$). Показатель относительного числа палочкоядерных нейтрофилов в крови у больных МФ в динамике также снижался (3,0 [2,0;4,0] vs. 2,0 [2,0;3,0] %, $P = 0{,}002$), в группе больных ОФ существенно не изменялся (2,0 [1,0;7,0] vs. 2,0 [1,0;3,0] %, $P = 0{,}88$), а у больных ОФЛИ значительно увеличивался (2,0 [2,0;12,0] vs. 13,0 [13,0;20,0] %, $P = 0{,}032$). Относительное число сегментоядерных нейтрофилов в крови при повторных исследованиях снижалось у больных МФ (69,0 [62,0;73,0] vs. 57,0 [52,0;64,0] %, $P < 0{,}001$) и ОФ (77,5 [60,0;84,0] vs. 56,6 [55,0;63,0] %, $P = 0{,}004$), но оставалось на неизменно высоком уровне у больных ОФЛИ (68,8 [64,0;69,0] vs. 72,0 [62,0;72,0] %, $P = 0{,}68$). В то же время, относительное число лимфоцитов в динамике увеличивалось у больных МФ (20,0 [15,0;23,0] vs. 28,0 [22,0;34,0] %, $P < 0{,}001$) и ОФ (11,0 [8,0;26,0] vs. 28,3 [24,0;31,0] %, $P = 0{,}003$), но оставалось значительно сниженным у больных ОФЛИ (15,0 [12,0;23,0] vs. 4,0 [3,0;24,0] %, $P = 0{,}68$), что свидетельствует об иммунодепрессии у этой группы пациентов. Показатель СОЭ в динамике снижался только в группе больных МФ (14,5 [9,0;20,0] vs. 8,0 [4,0;10,0] мм/ч, $P = 0{,}025$), но сохранялся на повышенном уровне у больных ОФ (13,0 [8,0;24,0] vs. 10,0 [8,0;17,0] мм/ч, $P = 0{,}63$) и ОФЛИ (17,0 [8,0;26,0] vs. 16,0 [6,0;28,0] мм/ч, $P = 0{,}89$).

Таким образом, для тяжелого и неблагоприятного течения КЭ у больных ОФ и ОФЛИ КЭ наиболее характерны лейкоцитоз, палочкоядерный и сегментоядерный нейтрофилез, ускорение СОЭ, а также лимфопения, которые в случае летального исхода имели тенденцию прогрессировать в динамике.

Кроме того, мы проанализировали некоторые показатели биохимического анализа крови у больных КЭ при поступлении в стационар (таблица 9). Установлено, что концентрация глюкозы в крови больных с ОФЛИ значительно выше (7,6 [6,4;8,2] ммоль/л), чем у пациентов с ЛФ (5,0 [4,0;5,4] ммоль/л, P < 0,001) и МФ (6,1 [4,9;6,9] ммоль/л, $P = 0,025$), но статистически значимо не отличалась от группы больных ОФ КЭ с благоприятным исходом (6,3 [4,4;7,1] ммоль/л, $P = 0,059$). Активность АЛТ в сыворотке крови значительно выше у больных ОФЛИ (71,0 [27,0;83,0] МЕ/л), по сравнению с пациентами с МФ (21,0 [18,0;28,6] МЕ/л, $P < 0,001$) и ЛФ (20,0 [17,0;25,0] МЕ/л, $P < 0,001$). Активность АСТ отмечена существенно выше в сыворотке крови больных ОФЛИ (57,0 [31,0;78,0] МЕ/л) и больных ОФ (36,0 [26,0;49,0] МЕ/л), чем у пациентов с МФ (17,4 [16,3;25,0] МЕ/л, $P < 0,001$ и P=0,002) и с ЛФ (22,5 [18,0;26,0] МЕ/л, $P < 0,001$ и $P = 0,002$).

Таким образом, для тяжелого и неблагоприятного течения КЭ у больных ОФ и ОФЛИ КЭ наиболее характерны повышение в крови концентрации глюкозы, а также АСТ и АЛТ.

Таблица 9 – Результаты биохимического анализа крови у больных различными клиническими формами острого клещевого энцефалита, *Me* [$Q_{0,25}$;$Q_{0,75}$]

Показатели	Клинические формы КЭ			
	ЛФ n = 33	МФ n = 54	ОФ n = 20	ОФЛИ n = 6
Глюкоза, ммоль/л	5,0 [4,0;5,4]	6,1 [4,9;6,9] $P_1 = 0,56$	6,3 [4,4;7,1] $P_1 = 0,54$ $P_2 = 0,68$	7,6 [6,4;8,2] $P_1 = 0,001$ $P_2 = 0,025$ $P_3 = 0,059$
АЛТ, МЕ/л	20,0 [17,0;25,0]	21,0 [18,0;28,6] $P_1 = 0,56$	24,0 [20,0;34,0] $P_1 = 0,29$ $P_2 = 0,64$	71,0 [27,0;83,0] $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$

Продолжение таблицы 9

Показатели	Клинические формы КЭ			
	ЛФ n = 33	МФ n = 54	ОФ n = 20	ОФЛИ n = 6
АСТ, МЕ/л	22,5 [18,0;26,0]	17,4 [16,3;25,0] P_1 = 0,75	36,0 [26,0;49,0] P_1 = 0,002 P_2 = 0,002	57,0 [31,0;78,0] P_1 < 0,001 P_2 < 0,001 P_3 = 0,004

Примечание – Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; ЛФ – лихорадочная форма; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; ОФЛИ – очаговая форма с летальным исходом; АЛТ – аланин аминотрансфераза; АСТ – аспартат аминотрансфераза; *Me*– медиана; $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$– квартили; n – численность группы; P_1– значимость различий значений показателя у больных МФ, ОФ или ОФЛИ от больных ЛФ; P_2– значимость различий значений показателя у больных ОФ или ОФЛИ от больных МФ; P_3– значимость различий значений показателя между группами больных ОФ и ОФЛИ

Анализ различных параметров ликвора при поступлении больных в стационар (таблица 10) позволил установить, что значения показателя плеоцитоза у больных ОФ (65,5 [51,0;388,0] клеток/мкл) существенно ниже, чем у больных МФ (332,5 [117,0;501,0] клеток/мкл, P = 0,021), что, по-видимому, связано с отсутствием или незначительной выраженностью менингеального воспаления у 5 из 20 обследованных нами больных ОФ, у которых диагностирован полиомиелитический (3) или полиоэнцефаломиелитический (2), а не менингоэнцефалитический вариант. У больных с ОФЛИ показатель плеоцитоза (216,5 [99,8;720,0] клеток/мкл) не имел достоверных отличий ни от больных МФ (P = 0,34), ни от группы больных ОФ (P = 0,32). У больных ОФ, по сравнению с больными МФ, выявлено более низкое число лимфоцитов в ликворе (41,5 [29,0;54,5] против 252,7 [74,0;388,5] клеток/мкл, P = 0,041). В группе больных ОФЛИ число нейтрофилов в ликворе напротив значительно выше, чем у больных МФ (100,5 [52,0;320,0] против 66,0 [22,0;180,0]) клеток/мкл, и P = 0,031). Вместе с тем, нами не было выявлено статистически значимых различий значений

показателей содержания белка или глюкозы в ликворе между обследованными группами больных КЭ ($P > 0,05$).

Таблица 10 – Результаты исследования ликвора у больных различными клиническими формами острого клещевого энцефалита, *Me* [$Q_{0,25}$;$Q_{0,75}$]

Показатели	Клинические формы КЭ		
	МФ n = 54	ОФ n = 20	ОФЛИ n = 6
Плеоцитоз, клеток/мкл	332,5 [117,0;501,0]	65,5 [51,6;388,8] P_1 = 0,021	216,5 [99,1;720,0] P_1 = 0,34 P_2 = 0,32
Лимфоциты в ликворе, клеток/мкл	252,7 [74,0;388,5]	41,5 [29,0;54,5] P_1 = 0,041	130,0 [21,0;394,0] P_1 = 0,65 P_2 = 0,39
Нейтрофилы в ликворе, клеток/мкл	66,0 [22,0;180,0]	27,5 [12,5;263,0] P_1 = 0,36	100,5 [52,0;320,0] P_1 = 0,031 P_2 = 0,48

Примечание – Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; ОФЛИ – очаговая форма с летальным исходом; *Me* – медиана; $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$ – квартили; n – численность группы; P_1– значимость различий значений показателя у больных ОФ или ОФЛИ от больных МФ; P_2– значимость различий значений показателя между группами больных ОФ и ОФЛИ

Кроме того, мы изучили основные показатели анализа спинномозговой жидкости в динамике при поступлении в стационар и спустя 7−10 дней после этого. Установлено, что показатель плеоцитоза в динамике имел четко выраженную тенденцию к снижению как у больных МФ (332,5 [117,0;501,0] vs. 63,5 [32,0;108,0] клеток/мкл, $P < 0,001$), так и у больных ОФ с благоприятным исходом (65,5 [51,0;388,0] vs. 29,0 [15,0;106,0] клеток/мкл, $P = 0,013$).

Число нейтрофилов и лимфоцитов в ликворе с течением времени значительно снижалось у больных МФ (66,0 [22,0;180,0] vs. 13,0 [3,5;26,0] клеток/мкл, $P < 0,001$ и 252,7 [74,0;388,5] vs. 41,0 [21,0;102,0] клеток/мкл, $P < 0,001$). В группе больных ОФ показано статистически значимое снижение в динамике только в отношении числа нейтрофилов (27,7 [12,5;263,0] vs. 6,0 [2,0;8,5] клеток/мкл, $P = 0,002$), но не в отношении числа лимфоцитов в ликворе (41,5 [29,0;54,5] vs. 22,0 [13,0;100,0] клеток/мкл, $P = 0,45$). Показатель белка при повторных исследованиях ликвора существенно снижался у больных МФ (0,46 [0,30;0,70] vs. 0,20 [0,2;0,3] г/л, $P < 0,001$), но сохранялся на прежнем уровне у больных ОФ (0,36 [0,18;0,61] vs. 0,20 [0,20;0,40] г/л, $P = 0,38$). Другие показатели, такие как содержание глюкозы и хлоридов в ликворе, не претерпевали существенных изменений в динамике как у больных МФ, так и в группе больных ОФ ($P > 0,05$).

В таблице 11 показаны результаты изучения показателя отношения шансов (ОШ) для параметров лабораторных тестов, которые показывают во сколько раз шанс иметь изучаемый признак в группе больных ОФ больше, чем в группе МФ КЭ.

Таблица 11 – Лабораторные предикторы очаговой формы клещевого энцефалита

Предикторы	Частота (%) в группах больных КЭ		ОШ (95 %ДИ)	χ^2	*P*
	ОФ n = 20	МФ n = 54			
Общий анализ крови Лейкоциты, > 11,9 $\times 10^9$/л	35,0	12,9	3,6 (1,1 – 12,2)	4,6	0,031
Сегментоядерные нейтрофилы, > 73 %	30,0	9,3	4,2 (1,1 – 15,8)	4,9	0,025
Лимфоциты, <10 %	30,0	7,4	5,4 (1,3 – 21,7)	6,4	0,011
СОЭ, > 20 мм/час	40,0	12,9	4,5 (1,3 – 14,8)	6,6	0,010
Биохимический анализ Глюкоза, > 6,5 ммоль/л	70,0	12,9	15,7 (4,5 – 54,3)	23,4	<0,001

Примечание – Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; ОШ – отношение шансов; 95 %ДИ – 95 % доверительный интервал; *P*– значимость различий

Установлено, что к показателям, имеющим прогностическое значение для диагноза ОФ КЭ в начальном периоде болезни, относятся: число лейкоцитов в крови более $11{,}9\times10^9$/л, число сегментоядерных нейтрофилов в крови более 73 %, число лимфоцитов в крови менее 10 %, значение показателя СОЭ более 20 мм/ч, концентрация глюкозы в крови более 6,5 ммоль/л.

Дополнительно показано, что у больных с ОФЛИ существенно чаще, чем в группе больных с МФ и ОФ с благоприятным исходом ($\chi^2 = 13{,}3$, $P = 0{,}003$ и $\chi^2 = 5{,}8$, $P = 0{,}009$), при микробиологическом посеве материала из носоглотки выделяли различные виды условно-патогенных бактерий (*Streptococcus viridans*, *Str. pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и др.). При этом следует подчеркнуть, что все

бактериологические посевы ликвора больных были отрицательны. У всех больных ОФЛИ был диагностирован острый респираторный дистресс-синдром взрослых с отеком легких, который послужил причиной смерти при явлениях нарастающей дыхательной недостаточности. У половины (у 50 % из 6 человек) пациентов ОФЛИ была диагностирована внутрибольничная долевая пневмония, а из мокроты в результате микробиологического анализа выделены бактерии *Pseudomonas spp.* или *Klebsiella spp.* У 4 (66,7 %) больных ОФЛИ был диагностирован острый энтероколит, вызванный теми же возбудителями, а у 5 пациентов (у 83,3 %) выявлен некротический нефроз, а также миокардит, что подтверждалось данными электрокардиограммы и биохимического анализа крови (увеличение активности выше нормы и нарастание в динамике АСТ, общей и МВ-фракции креатинкиназы).

Кроме того, в результате ROC-анализа установлено, что в ранние сроки заболевания «среднее» качество прогноза ОФ КЭ имел показатель концентрации глюкозы более 6,5 ммоль/л в крови (AUC = 0,61). Вероятность диагноза ОФ КЭ для этого показателя составила 79,9 %.

Таким образом, проведенное исследование позволило идентифицировать следующие наиболее информативные ранние лабораторные прогностические критерии повышенного риска ОФ КЭ (в период до появления очаговой симптоматики): нейтрофильный лейкоцитоз более 73 % с палочкоядерным сдвигом влево в лейкоцитарной формуле крови, относительную лимфопению менее 10 %, повышение показателя СОЭ более 20 мм/час и увеличение концентрации глюкозы более 6,5 ммоль/л в крови.

3.2 Иммунологические и цитогенетические прогностические критерии очаговой формы острого клещевого энцефалита

3.2.1 Показатели цитокинового статуса в культурах мононуклеарных клеток, имеющие прогностическое значение для очаговой формы клещевого энцефалита

Мы проанализировали спонтанные уровни продукции ИФ-α, ИФ-γ, ФНО-α, ИЛ-4 и ИЛ-10 в супернатантах культур мононуклеарных клеток крови больных различными клиническими формами КЭ (таблица 12). В исследование включено 22 пациента с диагнозом ЛФ, 23 больных с МФ и 15 больных ОФ острого КЭ, а также 22 здоровых добровольца в качестве контроля.

Показано, что продукция противовоспалительного цитокина ИЛ-4 статистически значимо выше, чем значения этого показателя в контроле только у больных МФ (3,3 [2,5;4,9] vs. 2,5 [1,7;2,9] пг/мл, $P < 0,001$), но не у пациентов с ОФ или ЛФ ($P > 0,05$). Кроме того, установлено, что секреция ИФ-α и ИФ-γ в супернатантах культур клеток больных ЛФ (35,3 [32,0;44,8] и 19,3 [12,3;33,4] пг/мл), МФ (25,3 [14,4;32,8] и 16,2 [12,4;25,6] пг/мл) и ОФ (15,3 [13,4;25,3] и 14,2 [10,8;16,0] пг/мл) существенно выше, чем в контрольной группе (3,1 [2,2;5,7] и 6,9 [5,5;8,4] пг/мл, $P < 0,001$ во всех случаях).

Аналогичные статистически значимые различия выявлены в отношении продукции провоспалительного цитокина ФНО-α и соотношения ФНО-α/ИЛ-4 у больных ЛФ (18,3 [13,9;22,2] пг/мл и 6,1 [2,7;9,5]), МФ (39,1 [15,9;48,3] пг/мл и 7,9 [6,8;13,5]) и у пациентов с ОФ (56,5 [45,9;58,8] пг/мл и 14,2 [2,9;11,2]), по сравнению с контролем (5,0 [3,8;6,9] пг/мл и 2,4 [1,4;3,3], $P < 0,001$ во всех случаях), что свидетельствовало о поляризации иммунного ответа по пути Т-хелперов (Th) типа 1 у больных КЭ (таблица 12).

Таблица 12 – Продукция цитокинов в культурах мононуклеарных клеток больных различными клиническими формами клещевого энцефалита, *Me* [$Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$]

Показатель	Контроль n = 22	Клинические формы КЭ		
		ЛФ n = 22	МФ n = 23	ОФ n = 15
ИФ-α, пг/мл	3,1 [2,2; 5,7]	35,3 [32,0; 44,8] $P_1 < 0,001$	25,3 [14,4; 32,8] $P_1 < 0,001$ $P_2 = 0,001$	15,3 [13,4; 25,3] $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$ $P_3 = 0,018$
ИФ-γ, пг/мл	6,9 [5,5; 8,4]	19,3 [12,3; 33,4] $P_1 < 0,001$	16,2 [12,4; 25,4] $P_1 < 0,001$ $P_2 = 0,038$	14,2 [10,8; 16,0] $P_1 = 0,004$ $P_2 = 0,011$ $P_3 = 0,31$
ИЛ-4, пг/мл	2,5 [1,7; 2,9]	3,1 [2,1; 3,6] $P_1 = 0,056$	3,3 [2,5; 4,9] $P_1 < 0,001$ $P_2 = 0,14$	3,4 [2,4;3,9] $P_1 = 0,084$ $P_2 = 0,92$ $P_3 = 0,26$
ИЛ-10, пг/мл	9,4 [7,1; 15,0]	17,0 [12,4; 29,3] $P_1 = 0,13$	19,2 [14,0; 34,2] $P_1 = 0,012$ $P_2 = 0,44$	33,6 [25,0; 37,1] $P_1 < 0,001$ $P_2 = 0,039$ $P_3 = 0,11$
ФНО-α, пг/мл	5,0 [3,8; 6,9]	18,3 [13,9; 22,2] $P_1 < 0,001$	39,1 [15,9; 48,3] $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	56,5 [45,9; 58,8] $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$

Продолжение таблицы 12

Показатель	Контроль n = 22	Клинические формы КЭ		
		ЛФ n = 22	МФ n = 23	ОФ n = 15
ФНО-α/ИЛ-4	2,4 [1,4; 3,3]	6,1 [2,7; 9,5] $P_1 = 0{,}001$	7,9 [6,8; 13,5] $P_1 < 0{,}001$ $P_2 = 0{,}062$	14,2 [2,9; 11,2] $P_1 < 0{,}001$ $P_2 < 0{,}001$ $P_3 < 0{,}001$

Примечание – Условные обозначения: ЛФ – лихорадочная форма; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; ИФ – интерферон; ИЛ – интерлейкин; ФНО – фактор некроза опухоли; *Me*– медиана; $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$ – квартили; n – численность группы; P_1– значимость различий значений показателя у больных ЛФ, МФ или ОФ от соответствующих значений в контрольной группе; P_2– значимость различий значений показателя у больных МФ или ОФ от соответствующих значений у больных ЛФ; P_3– значимость различий значений показателя между группами больных МФ и ОФ.

На это же указывало то, что продукция провоспалительного цитокина ФНО-α и значения показателя ФНО-α/ИЛ-4 достигали максимальных значений у больных ОФ и оказались существенно выше, по сравнению с соответствующими значениями у больных ЛФ и МФ заболевания ($P < 0{,}001$ во всех случаях). Вместе с тем, в супернатантах образцов крови больных МФ и, в особенности, ОФ продукция ИФ-α и ИФ-γ оказалась значительно ниже, чем у больных ЛФ ($P = 0{,}001$ и $P < 0{,}001$ для ИФ-α и P = 0,038 и $P = 0{,}011$ для ИФ-γ), что может быть связано со снижением функциональной активности Т-клеток. Кроме того, у больных ОФ продукция ИЛ-10 в супернатантах культур (33,6 [25,0;37,1]) существенно выше, чем у больных ЛФ (17,0 [12,4;29,3], $P = 0{,}039$) что, по-видимому, отражает направленность этого цитокина на ограничение воспалительной реакции у пациентов ОФ КЭ.

В таблице 13 проанализированы результаты изучения показателя отношения шансов (ОШ) для различных показателей цитокинового статуса.

Таблица 13 – Показатели цитокинового статуса в культурах мононуклеарных клеток крови, имеющие прогностическое значение для развития очаговой формы клещевого энцефалита

Предикторы	Частота (%) в группах больных КЭ		ОШ (95%ДИ)	χ^2	*P*
	ОФ n = 15	МФ n = 23			
ИФ-α, пг/мл < 20	73,3	30,4	6,3 (1,5 – 26,8)	6,7	0,011
ИФ-γ, пг/мл <15	66,7	21,7	7,2 (1,7 – 31,0)	7,7	0,006
ИЛ-10, пг/мл > 28	66,7	21,7	7,2 (1,5 – 31,0)	7,7	0,006
ФНО-α, пг/мл >43	80,0	13,0	26,7 (4,6 – 153,9)	14,3	<0,001
ФНО-α/ИЛ-4 >11	66,7	26,1	5,7 (1,4 – 23,5)	6,1	0,013

Примечание – Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; ИФ – интерферон; ИЛ – интерлейкин; ФНО – фактор некроза опухоли; ОШ – отношение шансов; 95% ДИ – 95% доверительный интервал; χ^2 – критерий значимости гипотезы; *P* – значимость различий

Установлено, что высокое прогностическое значение для диагноза ОФ КЭ продемонстрировали значения продукции ИФ-α ниже 20 пг/мл, ИФ-γ ниже 15 пг/мл, ИЛ-10 выше 28 пг/мл, ФНО-α выше 43 пг/мл и соотношения ФНО-α/ИЛ-4 больше 11.

На рисунках 7, 8 и в таблице 14 приведены результаты ROC-анализа с оценкой чувствительности и специфичности изученных показателей цитокинового статуса в качестве предикторов ОФ и МФ КЭ. Установлено, что «хорошее» или «очень хорошее» качество прогноза высокого риска развития ОФ КЭ имели значения продукции ИЛ-10 более 28 пг/мл, ФНО-α более 43 пг/мл и показателя ФНО-α/ИЛ-4 свыше 11. Выявлено, что предикторами МФ КЭ со

«средним» или «хорошим» качеством прогноза явились значения продукции ИФ-γ более 15 пг/мл и ИФ-α свыше 20 пг/мл.

Таблица 14 – Чувствительность и специфичность предикторов очаговой или менингеальной форм клещевого энцефалита на основе анализа цитокинового статуса

Предикторы	AUC / Качество прогноза	COV	Клиническая форма КЭ	Вероятность при значениях выше COV, %
ИФ-α, пг/мл	0,70/хорошее	20,0	МФ	88,9
ИФ-γ, пг/мл	0,64/среднее	15,0	МФ	75,2
ИЛ-10, пг/мл	0,72/хорошее	28,0	ОФ	90,8
ФНО-α,пг/мл	0,83/ очень хорошее	43,0	ОФ	95,1
ФНО/ИЛ-4	0,88/ очень хорошее	11,0	ОФ	98,9
Примечание – Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; ИФ – интерферон; ИЛ – интерлейкин; ФНО – фактор некроза опухоли; ROC-анализ (receiver operating characteristic); AUC (area under ROC curve) – площадь под ROC-кривой; COV (cut-off value) – значение оптимального порога отсечения				

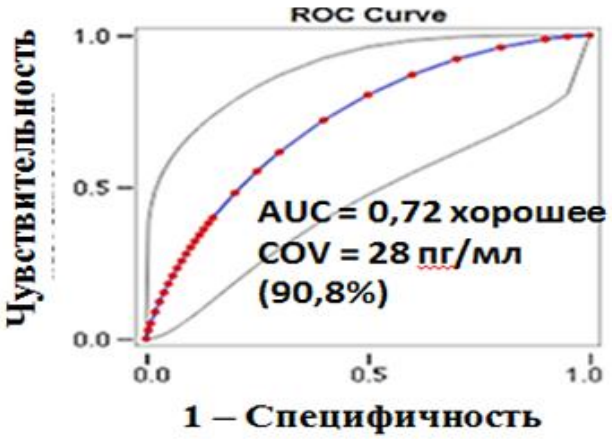
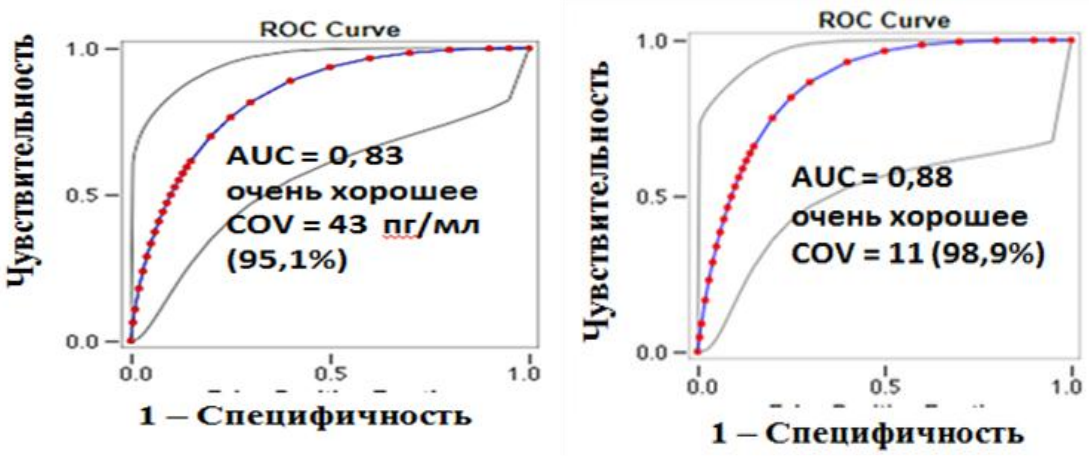


Рисунок 7 – Результаты ROC-анализа продукции интерлейкина (ИЛ)-10 в культурах мононуклеарных клеток крови, имеющее «хорошее» прогностическое значение для диагноза очаговой формы (положительные случаи), по сравнению с менингеальной формой (отрицательные случаи) клещевого энцефалита: (COV = 28 пг/мл, AUC = 0,72)



а *б*

Рисунок 8 – Результаты ROC-анализа продукции цитокинов в культурах мононуклеарных клеток крови, имеющих «очень хорошее» прогностическое значение для диагноза очаговой формы (положительные случаи), по сравнению с менингеальной формой (отрицательные случаи) клещевого энцефалита: *а*–фактор некроза опухоли альфа (ФНО-α) (COV = 43 пг/мл, AUC = 0,83); *б*–соотношение ФНО-α/ИЛ-4 (COV = 11, AUC = 0,88)

3.2.2 Уровень цитогенетических нарушений и показатель концентрации малонового диальдегида, имеющие прогностическое значение для очаговой формы клещевого энцефалита

Мы изучили один из показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активности окислительного стресса – концентрацию малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови, а также частоту клеток с цитогенетическими нарушениями (маркеров хромосомных аберраций и повреждения ДНК в клетках) с использованием двух методов: определение числа клеток буккального эпителия с микроядрами (МЯ) и частоты бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с МЯ периферической крови у больных ЛФ, МФ и ОФ КЭ (таблица 15). В исследование включено 22 пациента с диагнозом ЛФ, 23 больных с МФ и 15 больных ОФ острого КЭ, а также 22 здоровых добровольца в качестве контроля.

Таблица 15 – Частота встречаемости микроядер в клетках буккального эпителия и в бинуклеарных Т-лимфоцитах периферической крови, а также концентрация малонового диальдегида в сыворотке крови у больных различными клиническими формами клещевого энцефалита, *Me* [$Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$]

Показатель	Контроль n = 22	Клинические формы КЭ		
		ЛФ n = 22	МФ n = 23	ОФ n = 5
МДА, мкмоль/л	1,0 [0,4; 1,7]	2,6 [2,2; 4,1] $P_1 < 0,001$	4,3 [3,5; 6,6] $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	7,3 [6,1; 8,5] $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$
МЯ в буккальных клетках, ‰	0,3 [0,3; 0,4]	2,6 [2,3; 3,3] $P_1 < 0,001$	4,7 [3,2; 6,6] $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	10,6 [7,8; 12,4] $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$
МЯ в лимфоцитах, ‰	0,4 [0,2; 0,6]	3,2 [2,3; 4,5] $P_1 = 0,021$	5,6 [4,7; 7,5] $P_1 < 0,001$ $P_2 = 0,001$	11,5 [10,9; 21,8] $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$ $P_3 < 0,001$

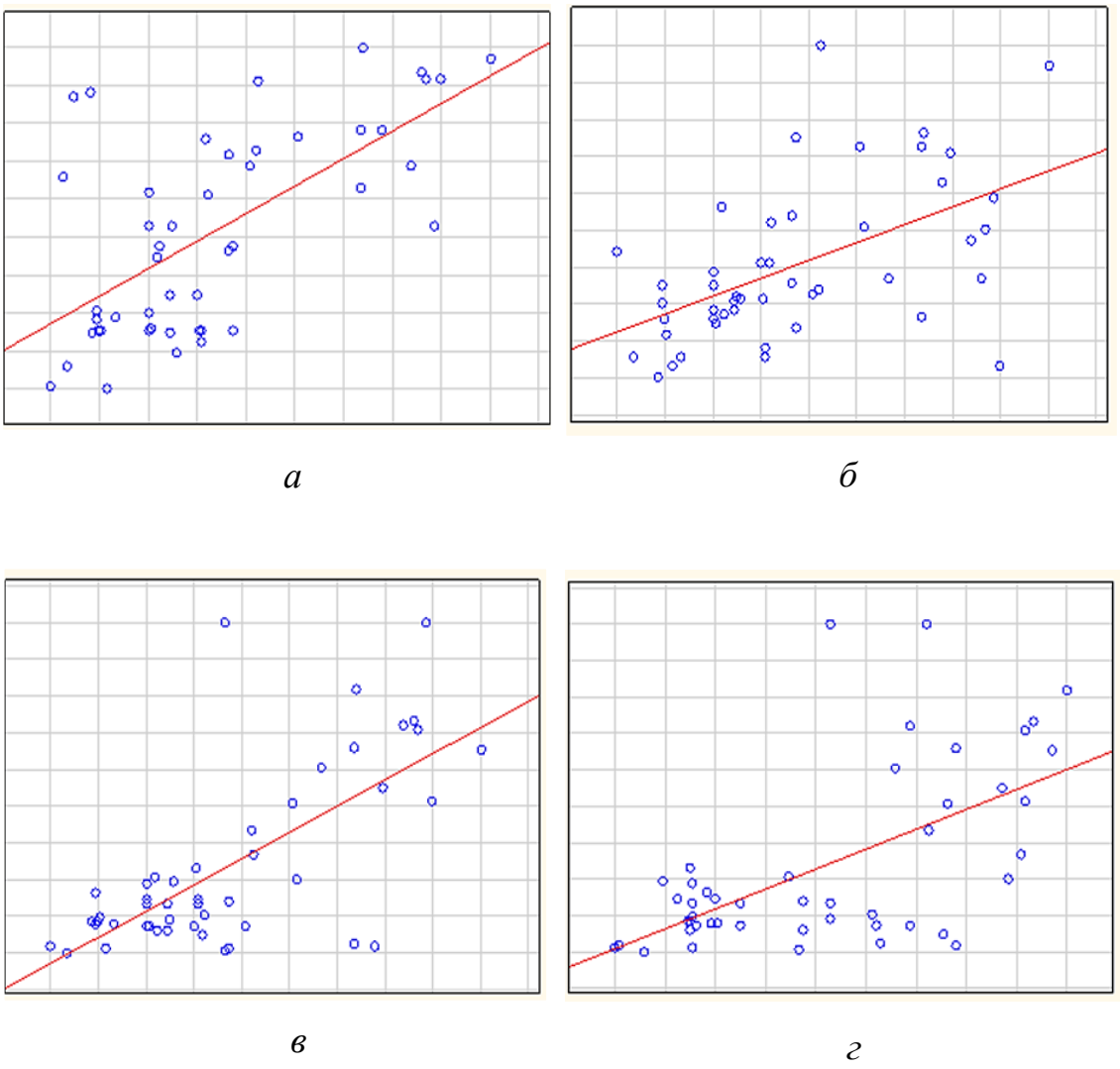
Примечание – Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; ЛФ – лихорадочная форма; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; МЯ – микроядро; МДА – малоновый диальдегид; *Me* – медиана; $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$ – квартили; n – численность группы; P_1– значимость различий значений показателя у больных ЛФ, МФ или ОФ от соответствующих значений в контрольной группе; P_2 – значимость различий значений показателя у больных МФ или ОФ от соответствующих значений у больных ЛФ; P_3 – значимость различий значений показателя между группами больных МФ и ОФ.

Установлено, что у больных с МФ и ОФ концентрация МДА в сыворотке крови (4,3 [3,5;6,6] и 7,3 [6,1;8,5] мкмоль/л), а также частота выявления клеток буккального эпителия с МЯ (4,7 [3,2;6,6] и 10,6 [7,8;12,4] ‰) и частота

лимфоцитов с МЯ (5,6 [4,7;7,5] и 11,5 [10,9;21,8] ‰) были значительно выше не только, чем в контроле (1,0 [0,4;1,7] мкмоль/л, 0,3 [0,3;0,4] ‰ и 0,4 [0,2;0,6] ‰, при $P < 0{,}001$ во всех случаях), но и по сравнению с пациентами с ЛФ (2,6 [2,2;4,1] мкмоль/л, 2,6 [2,3;3,3] ‰ и 3,2 [2,3;4,5] %, $P < 0{,}001$, $P < 0{,}001$ и $P = 0{,}021$ соответственно).

Известно, что ФНО-α активирует окислительный стресс и также как и МДА может характеризовать степень эндогенной интоксикации при инфекционном процессе, о чем свидетельствует прямая корреляционная связь между содержанием МДА в сыворотке крови больных КЭ и продукцией ФНО-α в супернатантах культур или показателем соотношения концентраций ФНО-α/ИЛ-4 ($r = 0{,}60$ и $r = 0{,}55$, $P < 0{,}001$ в обоих случаях; рисунок 9 *а–б*).

У больных КЭ также выявлена прямая корреляционная зависимость между частотой клеток буккального эпителия с МЯ, лимфоцитов с МЯ и концентрацией МДА в сыворотке или продукцией ФНО-α в супернатантах культур мононуклеарных клеток ($r = 0{,}57$, $r = 0{,}60$, $P < 0{,}001$ в обоих случаях; $r = 0{,}55$, $r = 0{,}53$, $P < 0{,}001$ в обоих случаях), что свидетельствовует о тесной взаимосвязи активности окислительного стресса и повреждения ДНК (рисунок 9 *в–г*).



а *б*

в *г*

Рисунок 9 – Результаты корреляционного анализа иммунологических и цитогенетических показателей у больных клещевым энцефалитом: *а*–зависимость между концентрацией малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови и продукцией фактора некроза опухоли (ФНО)-α (r = 0,60, P < 0,001); *б*–зависимость между концентрацией МДА в сыворотке крови и соотношением ФНО-α/интерлейкин-4 (r = 0,55, P < 0,001); *в*–зависимость между концентрацией МДА в сыворотке крови и частотой клеток буккального эпителия с микроядрами (МЯ) (r = 0,57, P < 0,001); *г*–зависимость между продукцией ФНО-α и частотой клеток буккального эпителия с МЯ (r = 0,55, P < 0,001)

В таблице 16 проанализированы результаты изучения показателя отношения шансов (ОШ) для концентрации МДА в сыворотке крови и

микроядерного анализа, которые показывают во сколько раз шанс иметь изучаемый признак в группе больных ОФ больше, чем в группе с МФ КЭ.

Таблица 16 – Цитогенетические показатели и концентрация малонового диальдегида в сыворотке крови, имеющие прогностическое значение для очаговой формы клещевого энцефалита

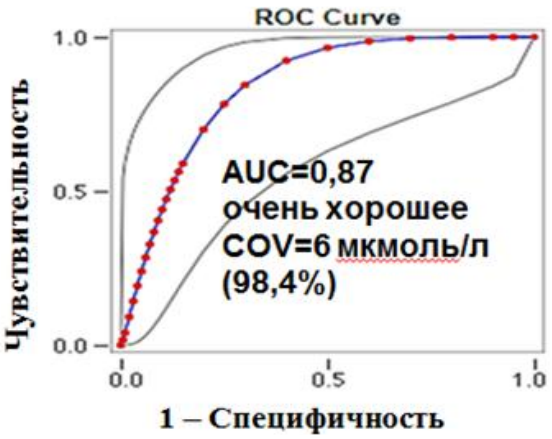
Предикторы	Частота (%) в группах больных КЭ		ОШ (95%ДИ)	χ^2	*P*
	ОФ n=15	МФ n=23			
Малоновый диальдегид, мкмоль/л > 6,0	66,7	13,0	13,3 (2,6 – 67,3)	9,3	0,001
Цитогенетические тесты					
Частота клеток буккального эпителия с МЯ, ‰ > 6,0	73,3	30,4	6,3 (1,5 – 26,8)	6,7	0,011
Частота бинуклеарных лимфоцитов с МЯ, ‰ > 9,0	73,3	13,0	18,3 (3,5 – 97,2)	11,7	< 0,001

Примечание– Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; МФ – менингеальная форма; ОФ – очаговая форма; МЯ – микроядра; ОШ – отношение шансов; 95%ДИ – 95% доверительный интервал; χ^2 – критерий значимости гипотезы; *P*– значимость различий

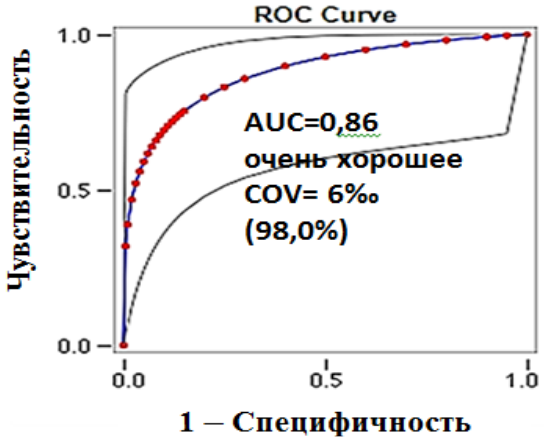
Установлено, что высокое прогностическое значение для диагноза ОФ КЭ продемонстрировали значения показателей МДА выше 6,0 мкмоль/л, число клеток буккального эпителия с МЯ более 6 ‰ и частота бинуклеарных Т-лимфоцитов с МЯ в периферической крови более 9 ‰.

На рисунке 10 и в таблице 17 приведены результаты ROC-анализа с оценкой чувствительности и специфичности изученных показателей в качестве предикторов ОФ КЭ. Установлено, что «очень хорошее» качество прогноза

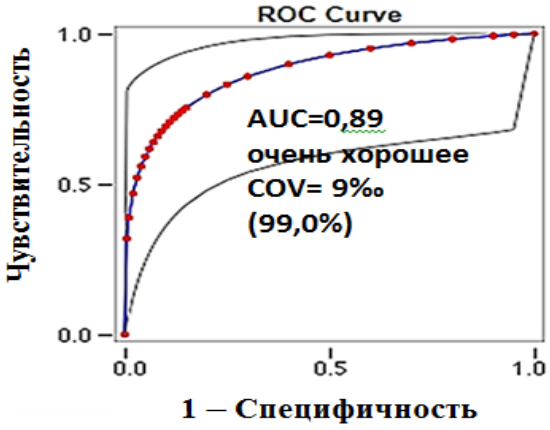
высокого риска развития ОФ имели концентрация МДА в сыворотке крови более 6 мкмоль/л, частота клеток буккального эпителия с МЯ свыше 6 ‰ и частота бинуклеарных Т-лимфоцитов с МЯ в периферической крови более 9 ‰.



а



б



в

Рисунок 10 – Результаты ROC-анализа концентрации малонового диальдегида и цитогенетических показателей, имеющих «очень хорошее» прогностическое значениедля диагноза очаговой формы (положительные случаи), по сравнению с менингеальной формой (отрицательные случаи) клещевого энцефалита: *а*–концентрация малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови (COV = 6 мкмоль/л, AUC = 0,87); *б*–частота клеток буккального эпителия с микроядрами (COV = 6 ‰, AUC = 0,86); *в*–частота бинуклеарных Т-лимфоцитов с микроядрами в периферической крови (COV = 9 ‰, AUC = 0,89)

Таблица 17 – Чувствительность и специфичность предикторов очаговой формы клещевого энцефалита на основе анализа концентрации малонового диальдегида и цитогенетических показателей

Предикторы	AUC / Качество прогноза	COV	Вероятность при значениях выше COV, %
Малоновый диальдегид, мкмоль/л	0,87/очень хорошее	6,0	98,4
Частота клеток буккального эпителия с МЯ, ‰	0,86/ очень хорошее	6,0	98,0
Частота бинуклеарных лимфоцитов с МЯ, ‰	0,89/ очень хорошее	9,0	99,0
Примечание – Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; МЯ – микроядра; ROC-анализ (receiver operating characteristic); AUC (area under ROC curve) – площадь под ROC-кривой; COV (cut-off value) – значение оптимального порога отсечения			

3.2.3 Модель прогноза очаговой или менингеальной форм клещевого энцефалита для формирования групп риска, разработанные на основе анализа данных иммунологических и цитогенетических тестов

В таблице 18 приведены результаты логистического регрессионного анализа иммунологических и цитогенетических параметров для прогностической модели 3. Модель прогностического риска МФ и ОФ КЭ, основана на данных спонтанной продукции ИЛ-10 в супернатантах культуры мононуклеарных клеток периферической крови, соотношения концентраций ФНО-α и ИЛ-4 в этих супернатантах, а также частоты клеток буккального эпителия с микроядрами. Для каждого показателя в таблице приведены коэффициенты регрессии (β) и указана условная шкала, которая позволяет рассчитать сумму баллов всех включенных в модель параметров для каждого пациента. Установлено, что модель 3 имеет «отличное» качество прогноза диагноза ОФ (AUC = 0,95 ± 0,04, $P < 0,001$).

Таблица 18 – Модель 3 прогноза очаговой или менингеальной форм клещевого энцефалита для формирования групп риска на основе анализа иммунологических и цитогенетических показателей

Предикторы	Баллы	α/β (95% ДИ)	Log-вероятность	χ^2	*P*
Модель 3		α = 0,58	−19,01		0,005
ФНО-альфа/ИЛ-4 < 5,5 5,5−8,4 8,5−11 > 11	 218 218 197 75	β = 0,030 (0.0017 – 0,026)	−15,2	7,62	0,005
ИЛ-10, пг/мл < 10 11−19 20−28 > 28	 218 200 227 114	β = 0,038 (0,001 – 0,076)	−10,4	9,59	0,002
Частота буккальных клеток с МЯ, ‰ <2,5 2,5−5,0 5,1−10,4 10,5−13,9 > 13,9	 218 218 98 122 122	β = 0,020 (0,001 – 0,039)	−7,19	6,42	0,011
Примечание – Условные обозначения: α – константа регрессии; β – коэффициент регрессии; 95 %ДИ – 95 % доверительный интервал; χ^2 – критерий «хи-квадрат»; *P* – значимость различий					

Установлено, что при сумме баллов (COV модели) равной 454 (или в интервале 388−454) чувствительность составит 78 %, специфичность – 95,6 %, а отрицательные и положительные прогностические значения – 0,88 и 0,91

(рисунок 11). Это означает, что если COV в балльной шкале равен 454 (или находится в интервале 388–454), то вероятность диагноза ОФ составит 78 %, а вероятность МФ не более 4,4 % (рисунок 12). В случае получения суммы баллов ниже 388 вероятность диагноза МФ равна нулю, а ОФ – более 78 %. Если сумма баллов варьирует в интервале 454–558, то вероятность ОФ снижается от 78 % до 0, а вероятность МФ, напротив, возрастает до 52,2 % (так называемая, «серая» зона, где шансы развития ОФ и МФ равновероятны). Если COV модели достигнет более 558 баллов, то вероятность МФ составит более 52,2 %, а вероятность ОФ достигнет нуля (чувствительность равна 100 %, специфичность – 52,2 %).

Таким образом, модель 3 потенциально может быть применена для формирования групп повышенного риска ОФ КЭ и показывает тесную взаимосвязь между активацией окислительного стресса, продукцией провоспалительных цитокинов и индукцией цитогенетических нарушений у больных КЭ.

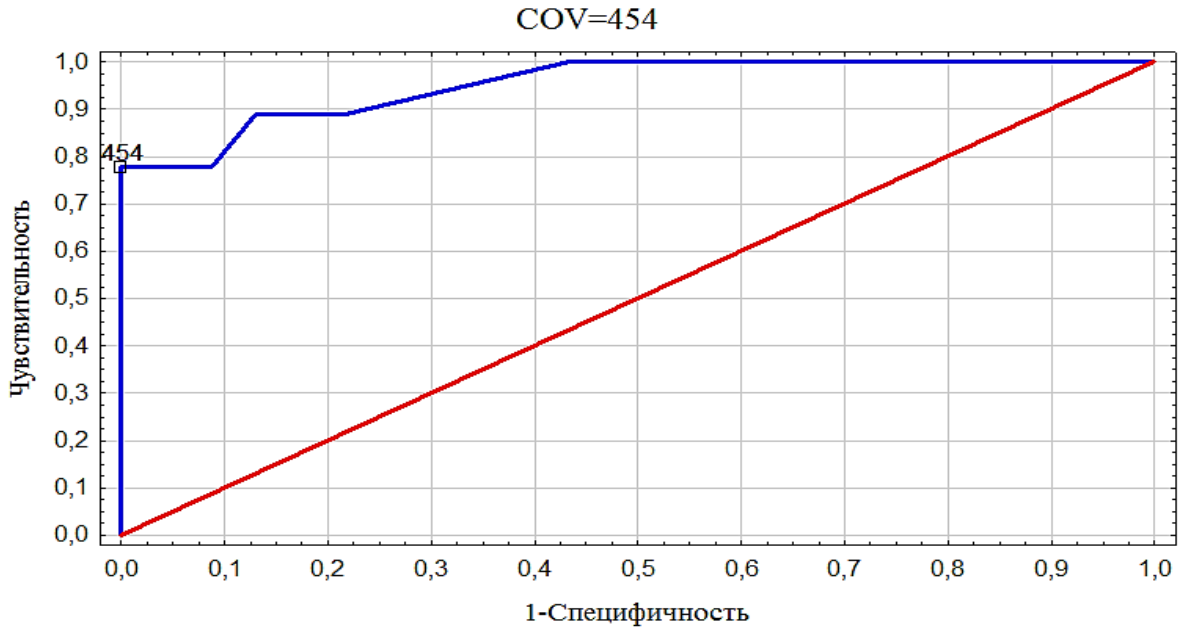


Рисунок 11 – Результаты ROC-анализа модели прогноза очаговой (положительные случаи) и менингеальной форм (отрицательные случаи) клещевого энцефалита на основе анализа данных иммунологических и цитогенетических тестов (COV = 454 баллов, AUC = 0,95 ± 0,04, $P < 0,001$)

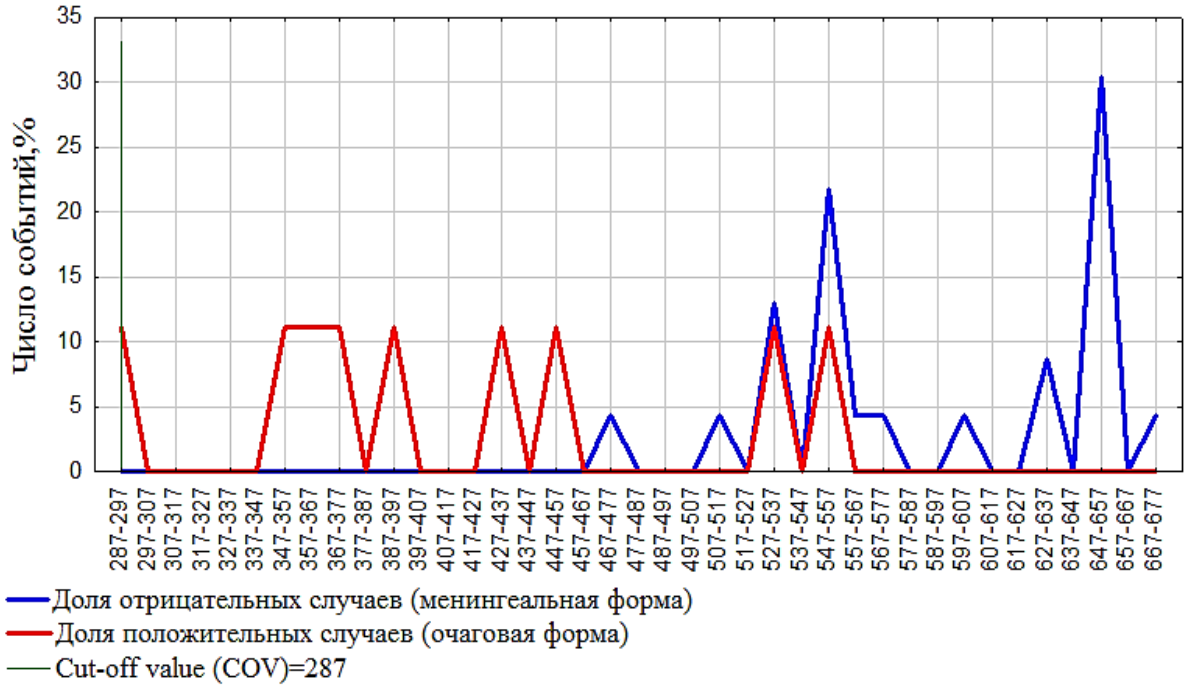


Рисунок 12 – Информативность модели прогноза очаговой (положительные случаи) и менингеальной форм (отрицательные случаи) клещевого энцефалита на основе анализа данных иммунологических и цитогенетических тестов (COV = 454 баллов, AUC = 0,95 ± 0,04, $P < 0,001$). Ось x – интервалы в условных баллах; ось y – число событий (случаев очаговой или менингеальной форм в %)

Кроме того, проведенное исследование позволило идентифицировать следующие прогностические критерии повышенного риска ОФ КЭ в начальном периоде болезни на основе анализа показателей микроядерного теста и цитокинового статуса: частота встречаемости клеток буккального эпителия с МЯ более 6 ‰ и частота бинуклеарных Т-лимфоцитов с МЯ в периферической крови более 9 ‰; уровни продукции в супернатантах культур мононуклеарных клеток ИЛ-10 более 28 пг/мл, ФНО-α более 43 пг/мл и показателя соотношения концентрации ФНО-α/ИЛ-4 свыше 11, снижение продукции ИФ-γ менее 15 пг/мл и ИФ-α менее 20 пг/мл, а также увеличение концентрации МДА в сыворотке крови более 6 мкмоль/л.

3.2.4 Характеристика практического применения моделей прогноза очаговой и менингеальной форм клещевого энцефалита для формирования групп повышенного риска

Таким образом, на основании анализа клинико-эпидемиологических данных, а также показателей цитокинового и цитогенетического статусов, выявлены наиболее значимые прогностические критерии и построены три математические модели с применением бинарной логистической регрессии и ROC-анализа, позволяющие формировать группы повышенного риска МФ и ОФ моноинфекции острого КЭ в начальном периоде болезни (от момента начала лихорадки до появления очаговых симптомов). Для всех параметров, включенных в модели, приведены шкалы, которые позволяют рассчитать сумму баллов для каждого пациента (рисунок 13). Полученный результат вычислений необходимо сравнить со значениями порогов отсечения (COV), приведенными в таблице 19, для оценки вероятности развития ОФ КЭ.

Модель 1	
Возраст, в годах	Баллы
< 20	164
20-22	151
22-27	136
27-32	156
32-35	164
35-41	156
42-49	99
49-53	133
53-69	99
>69	75
День поступления от начала болезни	
< 3	108
3-4	153
4-5	193
5-6	133
6-7	110
>7	97
Пульс, в мин	
< 64	113
65-71	130
72-80	133
81-92	47
> 92	26
Дезориентация	
• Нет	165
• Возбуждение	102

Модель 2	
Сознание	
• Ясное	569
• Оглушенность	517
• Сопор	-596
• Делирий	-566
• Кома	-566
Речь	
• Норма	532
• Спутанная	-27
• Отсутствие	-562
Рвота	
• Нет	-3
• Есть	-35

Модель 3	
ФНО-альфа/ИЛ-4	
< 5,5	218
5,5-8,4	218
8,5-11	197
>11	75
ИЛ-10, пг/мл	
< 10	218
11-19	200
20-28	227
>28	114
Частота буккальных клеток с МЯ, ‰	
< 2,5	218
2,5-5,0	218
5,1-10,4	98
10,5-13,9	122
> 13,9	122

Рисунок 13 – Математические модели прогноза менингеальной и очаговой форм моноинфекции острого клещевого энцефалита в начальном периоде заболевания

Таблица 19 – Вероятность диагноза очаговой или менингеальной форм клещевого энцефалита в зависимости от значений количественной оценки в баллах (COV) условной шкалы для разработанных моделей

Модель	Сумма в баллах (COV)	Вероятность диагноза	
		ОФ КЭ	МФ КЭ
Модель 1	< 405	более 85 %	0
	478 – 405	85 %	не более 3,7 %
	478 – 595	между 85 % и 0	3,7 % – 40,7 %
	> 595	0	более 40,7 %
Модель 2	<-1123	более 85 %	0
	−1123 –-67	85 %	не более 1,85 %
	−67 – 750	между 85 % и 0	1,85 %–100 %
	>750	0	100 %
Модель 3	<388	более 78 %	0
	388 – 454	78 %	не более 4,4 %
	454 – 558	между 78 % и 0	4,4 % – 52,2 %
	>558	0	более 52,2 %
Примечание – Условные обозначения: COV (cut-off value) – значение оптимального порога отсечения			

Все модели показали отличное качество прогностических возможностей. Кроме того, каждая модель представлена в виде удобной шкалы с количественной оценкой каждого параметра в балльной системе. Следует подчеркнуть, что эти алгоритмы не предназначены для диагностики клинических форм, определения степени тяжести течения или прогноза исходов болезни.

Разработанные нами модели являются полезным дополнительным инструментом, который может быть использован практическим врачом для формирования групп повышенного риска менингеальной и очаговой форм КЭ в начальном периоде заболевания.

3.2.5 Цитогенетические последствия у больных клещевым энцефалитом в зависимости от вариантов генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1* в генотипе

Мы проанализировали в динамике частоту клеток с цитогенетическими нарушениями у 53 больных ЛФ КЭ в острый и реконвалесцентный периоды болезни в зависимости от вариантов генов глутатион-S-трансферазы *GSTM1* и *GSTT1* в генотипе больного. В качестве контроля в исследовании участвовали 57 здоровых добровольцев. Известно, что глутатион-S-трансферазы способствуют защите организма от широкого круга химических соединений, включая реактивные формы кислорода и другие потенциальные мутагены. Установлено, что носительство мутантных неактивных вариантов генов *GSTM1* и *GSTT1* часто сопровождается цитогенетической нестабильностью и повышенной чувствительность хромосомного аппарата человека к различным мутагенным факторам.

В таблице 20 приведены результаты изучения частоты клеток буккального эпителия с МЯ (‰) в динамике при госпитализации, через 1 и 3 месяца у больных с ЛФ КЭ в зависимости от носительства активных (+) или мутантных (0) аллелей генов глутатион-S-трансферазы *GSTM1* и *GSTT1*.

Результаты показали существенные повышение частоты клеток буккального эпителия с МЯ у больных ЛФ КЭ с различными сочетаниями аллелей генов *GSTM1* и *GSTT1*, по сравнению с соответствующими подгруппами в контроле($P < 0{,}001$ во всех случаях). Наиболее значительное повышение частоты клеток с МЯ установлено у больных-носителей мутантных неактивных аллелей генов *GSTM1*(0/0) и *GSTT1*(0/0), по сравнению с группами больных ($P < 0{,}001$ во всех случаях), имевших активные варианты этих генов (*GSTM1*(+)/*GSTT1*(0/0), *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(+) или *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+)). Так, например, в группах больных КЭ при поступлении в стационар частота клеток с МЯ у носителей нулевых аллелей генов *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(0/0) статистически значимо выше, чем

у больных с активными вариантами *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+) этих генов (5,03 ± 0,16 ‰ vs. 2,20 ± 0,08 ‰, P < 0,001).

Таблица 20 –. Частота клеток буккального эпителия с микроядрами (‰) в динамике при госпитализации, через 1 и 3 месяца у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита в зависимости от носительства активных (+) или мутантных (0) аллелей генов глутатион-S-трансферазы *GSTM1* / *GSTT1*, $\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$

Группы	Генотипы с активными (+) или неактивными (0) аллелями генов *GSTM1* и *GSTT1*			
	GSTM1 (0/0)/ *GSTT1* (0/0)	*GSTM1* (+)/ *GSTT1* (0/0)	*GSTM1* (0/0)/ *GSTT1*(+)	*GSTM1* (+)/ *GSTT1* (+)
Контроль	0,31 ± 0,04 n = 11	0,32 ± 0,04 n = 12	0,39 ± 0,05 n = 12	0,20 ± 0,02 n = 22
Больные КЭ Госпитализация	5,03 ± 0,16* n = 11	2,41 ± 0,16* n = 14 *P* < 0,001	3,46 ± 0,18* n = 18 *P* < 0,001	2,20 ± 0,08* n = 10 *P* < 0,001
Через 1 месяц	0,76 ± 0,07*^ n = 10	0,38 ± 0,05^ n = 13 *P* < 0,001	0,48 ± 0,04^ n = 14 *P* = 0,003	0,23 ± 0,04^ n = 10 *P* < 0,001
Через 3 месяца	0,39 ± 0,09 n = 10	0,29 ± 0,05 n = 14	0,4 ± 0,12 n = 17	0,21 ± 0,10 n = 11

Примечание – Условные обозначения: КЭ – клещевой энцефалит; МЯ – микроядра; $\bar{X}$ – выборочное среднее; $s_{\bar{x}}$ – стандартная ошибка; n – численность группы; *P*– значимость различий значений показателя у больных с генотипами *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0/0), *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(+) или *GSTM1*(+)/*GSTT1* (+), от соответствующих значений в группе больных с генотипом *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(0/0); знаком «*» обозначена значимость различий значений показателя в группах больных от соответствующих значений в контрольных группах (*P* < 0,001);знаком «^» обозначена значимость различий значений показателя между группами больных в динамике при госпитализации и через 1 мес. (*P* < 0,001)

Кроме того, изучены показатели частоты буккальных клеток с МЯ отдельно для гена *GSTM1* и гена *GSTT1*. Установлено, что у 90 % больных КЭ носителей

нулевого аллеля гена *GSTM1*(0/0) частота буккальных клеток с МЯ выше 2,5 ‰, в то время среди больных, имеющих в своем генотипе активный вариант аллеля этого гена *GSTM1*(+), только у 29,2 % этот показатель превышал это значение (ОШ = 21,6, χ^2 = 21,1, P < 0,001). Вместе с тем, таких достоверных различий в зависимости от частоты встречаемости клеток с МЯ более 2,5 ‰ между подгруппами больных с нулевыми (44 %) и активными аллелями (24,1 %) гена *GSTT1* обнаружено не было (ОШ = 2,5, χ^2 = 2,4, P = 0,12). Это свидетельствует о том, что выявленное существенное повышение частоты клеток с цитогенетическими нарушениями в обследованной группе больных КЭ зависело, прежде всего, от присутствия в генотипе больного нулевого аллеля гена *GSTM1*(0/0), а не гена *GSTT1*(0/0).

Эта закономерность нашла своё подтверждение в результатах ROC-анализа и определения площади под ROC-кривой (AUC) и значений порога отсечения (COV) показателя частоты клеток буккального эпителия с МЯ отдельно для нулевых и активных аллелей гена *GSTM1* и гена *GSTT1*. Установлено «отличное» качество прогноза частоты клеток буккального эпителия с МЯ более 2,5 ‰ у больных ЛФ КЭ, имеющих нулевой аллель гена *GSTM1*(0/0) (AUC = 0,94), но не гена *GSTT1*(0/0) (AUC = 0,57, P > 0,05) (рисунок 14).

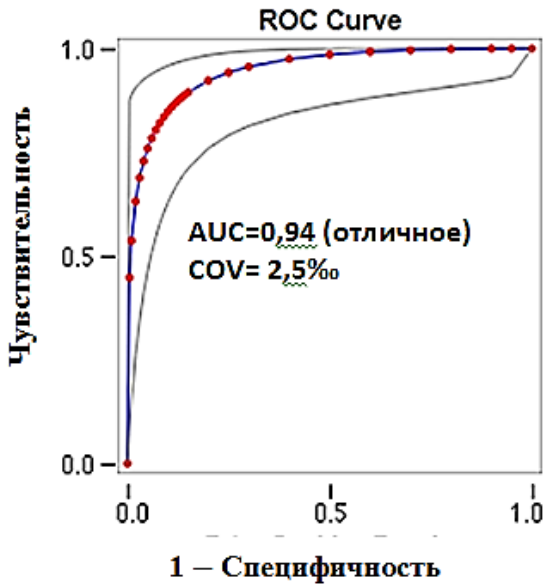


Рисунок 14 – Результаты ROC-анализа частоты клеток буккального эпителия с МЯ в зависимости от носительства нулевого аллеля гена *GSTM1*(0/0) (положительные случаи) или активного аллеля этого гена *GSTM1*(+) (отрицательные случаи) у больных лихорадочной формой клещевого энцефалита (COV = 2,5 ‰, AUC = 0,94, $P < 0,001$)

Через 1 мес. после курса терапии (таблица 20) в подгруппах больных ЛФ КЭ, имеющих сочетания аллелей *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0/0), *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(+) или *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+),установлено существенное снижение частоты клеток буккального эпителия с МЯ, по сравнению с соответствующими значениями в подгруппах в период поступления в стационар ($P < 0,001$). Значения частоты клеток буккального эпителия с МЯ в этих подгруппах больных в период реконвалесценции не имели достоверных отличий от соответствующих подгрупп с генотипами *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0/0), *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(+) или *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+) в контроле (P > 0,05). Исключение составила лишь подгруппа больных КЭ, имеющих неактивные варианты обоих генов *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(0/0), в которой частота клеток буккального эпителия с МЯ через 1 мес. после начала лечения существенно снижалась, по сравнению с соответствующими значениями показателя при госпитализации (0,76 ± 0,07 ‰ vs. 5,03 ± 0,16 ‰, $P < 0,001$), но все ещё оставалась статистически значимо выше, чем

в соответствующей подгруппе в контроле (0,76 ± 0,07 ‰ vs. 0,31 ± 0,04 ‰, $P < 0,001$). Частота клеток буккального эпителия с МЯ у больных-носителей неактивных аллелей генов *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(0/0) через 1 месяц после терапии оставалась выше, чем соответствующие значения в остальных подгруппах больных с различными сочетаниями аллелей *GSTM1*(+)/*GSTT1*(0/0) ($P < 0,001$), *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(+) ($P = 0,003$) или *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+) ($P < 0,001$). В подгруппе реконвалесцентов КЭ с генотипом *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(0/0) частота буккальных клеток с МЯ достоверно не отличалась от соответствующих показателей в контроле только через 3 мес. после госпитализации и курса терапии ($P > 0,05$).

Таким образом, мы установили существенные различия в частоте и длительности персистирования клеток буккального эпителия с МЯ между группами больных ЛФ КЭ в зависимости от носительства активных (+) или мутантных (0) аллелей генов глутатион-S-трансферазы *GSTM1* и *GSTT1*. Наиболее значительное повышение этих показателей выявлено у больных КЭ, в генотипе которых присутствовали неактивные формы генов *GSTM1*(0/0) / *GSTT1*(0/0) и, в особенности, гена *GSTM1*(0/0).

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1 Эпидемиологические и анамнестические предикторы клинических форм клещевого энцефалита

В результате проведенных нами исследований установлено, что риск развития ОФ КЭ увеличивается с возрастом больного, наличием у больного двух и более фоновых соматических заболеваний, а также в случае локализации укуса клеща в области головы и при позднем поступлении больного в стационар (более 7 дней от начала лихорадки). Аналогичные результаты показаны в работе В. В. Проворовой с соавт. – более тяжелое течение КЭ чаще наблюдалось у больных с неопределенным анамнезом присасывания клеща, которые поздно обращались за медицинской помощью [13]. Однако, по данным ряда других авторов [26, 29, 38], поздняя госпитализация в стационар (после пятого дня заболевания) встречалась при всех формах КЭ без статистически значимых различий.

Среди обследованных нами групп больных, также как и по данным большинства других авторов [7, 14, 27 38, 50], доминировал трансмиссивный путь передачи КЭ. В отличие от других исследователей [14, 27, 38, 41], нам не удалось выявить четкие связи между повышенным риском ОФ заболевания и отрицанием факта присасывания клеща и/или их множественными укусами. Некоторые авторы отмечают, что наиболее высокая частота встречаемости ОФ и повышенный риск летального исхода при КЭ ассоциированы с присасыванием клеща в области головы [24, 45, 56], что может быть связано с более быстрым проникновением вируса через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ), и эти данные совпадают с полученными нами результатами. Вместе с тем, по данным других авторов [41], какая-либо достоверная связь между локализацией присасывания клеща на теле и клинической формой заболевания отсутствует.

Продолжительность инкубационного периода при всех формах КЭ не имела статистических различий [26, 38], что совпадало с полученными нами данными.

По данным одних авторов [25, 64, 67, 156, 175, 183] фактором риска ОФ КЭ рассматривается возраст больного более 60 лет, а по данным ряда других исследователей [14, 26, 29] прогностическим критерием развития ОФ и неблагоприятных исходов заболевания является возраст больного старше 45 лет, что почти совпадает с полученным нами результатом – возрастом более 41 года.

В результате проведенных нами исследований установлено, что различные фоновые соматические заболевания значительно чаще встречались у больных с ОФ КЭ, и в особенности с ОФЛИ, по сравнению с больными, имевшими МФ. Нами показано, что в группах больных ОФ и ОФЛИ статистически значимо чаще встречались одновременно несколько различных фоновых заболеваний (более двух) у одного пациента. Анализ структуры фоновых заболеваний впервые показал, что больные ОФ с благоприятным и, в особенности, с летальным исходом достоверно чаще имели сахарный диабет 2-го типа, ГБ, ИБС, ожирение. В результате исследования также выявлена прямая зависимость между возрастом больного, числом сопутствующих заболеваний у больного КЭ и степенью выраженности нарушения сознания.

В работах нескольких авторов [13, 14, 50] также изучалась роль сочетанной соматической патологии и снижения иммунореактивности организма в развитии клинически более тяжелых форм КЭ. Показано, что к факторам риска МФ и ОФ КЭ, по сравнению с ЛФ, можно отнести сочетанную соматическую патологию дегенеративного характера, включающую чаще всего сердечно-сосудистые заболевания, а также исходное поражение центральной нервной системы (инфаркт миокарда, инсульт, гипотиреоз, хроническую сердечную недостаточность, сахарный диабет и другие заболевания). В работах Е. О. Утенковой с соавт. [64, 67] также показано, что лица пожилого возраста имеют повышенный риск развития очаговых форм КЭ и летального исхода, что прямо коррелирует с наличием тяжелых сопутствующих соматических заболеваний.

Большинство российских исследователей, в отличие от проведенного нами исследования, не делали акцент на изучении роли таких фоновых соматических заболеваний как сахарный диабет, ГБ или ИБС в качестве факторов риска развития ОФ и летального исхода КЭ. Тем не менее, в нескольких работах европейских и американских авторов установлено, что у больных лихорадкой Западного Нила (ЛЗН) высокий риск менингоэнцефалита (нейроинвазивной формы болезни) и летального исхода ассоциирован с возрастом более 60 лет, артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа [97, 138,142, 159].

4.2 Клинические предикторы менингеальной и очаговых форм клещевого энцефалита

Анализ данных жалоб, объективного статуса у больных МФ и ОФ КЭ показал, что высокую прогностическую ценность ранних предикторов риска ОФ имели показатели систолического и диастолического давления выше 140 и 90 мм рт. ст. соответственно, частоты пульса выше 90 в мин., частоты дыхательных движений более 20 в мин., а также повышения температуры тела в первые дни болезни выше 39,5^{o}C. Кроме того, нами установлено, что в качестве прогностических критериев высокого риска развития ОФ следует обращать особое внимание на появление оглушенности, дезориентации, спутанной речи, грубой ригидности затылочных мышц, симптомов Кернига, Брудзинского и рвоты.

В литературе имеются противоречивые данные относительно возможности прогнозирования ОФ КЭ и исходов болезни в первые дни заболевания.

По данным большинства исследователей высота и динамика температуры тела в ранние сроки болезни имеет важное прогностическое значение для оценки риска ОФ КЭ [7; 13, 50]. Например, показано, что ОФ КЭ существенно чаще регистрировалась у больных с фебрильной лихорадкой в первые дни болезни, у которых температура тела имела тенденцию к росту [14, 27, 29, 46]. Кроме того, известно, что лихорадочный период у больных ОФ и МФ КЭ, был существенно

более долгим, по сравнению с пациентами с ЛФ [7, 14, 26, 27]. Полученные нами данные полностью согласуются с результатами исследования А. Б. Коньковой-Рейдман с соавт. [30], которые показали, что у большинства больных МФ КЭ, даже при тяжелом течении, максимальная температура тела не превышала 39,2^{o}С, а длительность температурной реакции редко была более 10 суток.

По данным А. Л. Бондаренко с соавт. [14, 26, 27], одним из ранних предикторов ОФ КЭ является появление на первой неделе психопатологических симптомов, тахипноэ, последующего развития судорожного синдрома, нарушения координации движений, свидетельствующих о мозжечковой дисфункции. По данным этих авторов к концу первой недели заболевания регистрируется нарушение сознания, после чего появляются признаки нарушения функций черепных нервов и двигательные нарушения [14, 26, 27, 29]. В своем исследовании мы также отметили, что степень нарушения сознания имеет прямую зависимость от клинической формы заболевания.

Полученные нами результаты отчасти совпадали с данными исследования Л. И. Волковой [7], в котором показано, что у больных ОФ КЭ наблюдаются наиболее выраженные гемодинамические и дыхательные нарушения, включавшие: тахикардию более 80 ударов в мин., тахипноэ более 27 дыханий в мин., повышение систолического и диастолического АД и лихорадку свыше 38,1^{o}С. Эти симптомы можно рассматривать как предикторы очаговой симптоматики [7].

В нашем исследовании у больных ОФ с менингоэнцефалитом значительно чаще, чем у пациентов с МФ КЭ выявлялись грубая ригидность затылочных мышц, более выраженные симптомы Кернига и Брудзинского, а также продолжительность рвоты, что свидетельствует о значительной тяжести менингеальной симптоматики. Подобная закономерность отмечалась некоторыми другими авторами. Например, также как в проведенном нами исследовании менингеальные симптомы у больных ОФ КЭ встречались реже, чем у пациентов с МФ заболевания [14, 26, 29], но протекали более тяжело и длительно. [7].

Согласно данным, полученным В. В. Проворовой [50], появление грубой ригидности затылочных мышц и симптома Кернига, а также указания на появление рвоты в первые дни болезни можно рассматривать как прогностические признаки ОФ КЭ.

Изучение продолжительности симптомов заболевания, отражающих тяжесть течения КЭ, показало, что у больных ОФ КЭ, по сравнению с пациентами МФ, отмечалась более значительная длительность таких жалоб как боль в спине, тошнота, головная боль, чувство онемения конечности, нарушения зрения в виде диплопии или мелькания «мушек», миалгия, а также повышение температуры тела. Кроме того, нами установлено, что пациенты с ОФ заболевания, по сравнению с МФ, имеют большую продолжительность нарушения координации движений, менингеальных симптомов и дезориентации, что нашло отражение в работах других авторов [14, 26].

4.3 Общеклинические лабораторные предикторы клинических форм клещевого энцефалита

В результате изучения показателей общеклинического анализа крови у обследованных нами больных КЭ установлено, что прогностическими критериями повышенного риска ОФ в начальном периоде болезни являются относительная лимфопения, относительный нейтрофильный лейкоцитоз с палочкоядерным сдвигом влево в лейкоцитарной формуле крови и повышение показателя СОЭ. Изучение основных показателей общеклинического анализа крови в динамике показало, что в то время как у больных МФ значения показателя СОЭ, число лейкоцитов, относительное число палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов снижались, а число лимфоцитов повышалось, в группе больных ОФ длительно сохранялся лейкоцитоз, относительный палочкоядерный и сегментоядерный нейтрофилез, повышенные показатели СОЭ и лимфопения, а в случае летального исхода ОФ эти изменения имели четко выраженную тенденцию к прогрессированию.

В соответствие с данными большинства авторов особенностью больных КЭ с очаговой симптоматикой в отличие от пациентов с ЛФ и МФ является более значительное повышение числа лейкоцитов (в среднем около $9{,}5\times10^9$/л) [14,22, 26,33, 50, 52] в общем анализе крови. Более того, к неблагоприятным прогностическим факторам риска развития ОФ можно отнести увеличение числа лейкоцитов преимущественно за счет фракции сегментоядерных нейтрофилов (около 74%) в отличие от больных МФ и ЛФ, где ведущая роль принадлежала лимфоцитам [22]. Другим важным прогностическим критерием ОФ была относительная лимфопения, по сравнению с ЛФ и МФ КЭ [5,22, 52] в общеклиническом анализе крови. Выраженная лимфопения наиболее часто встречалась у больных ОФ с летальным исходом [14, 22, 28, 52], а увеличение СОЭ преимущественно регистрировалось у больных менингеальной или очаговой формой болезни [6, 7]. Таким образом, к прогностическим факторам риска развития ОФ КЭ, в том числе риска летального исхода в ранние сроки заболевания можно отнести лейкоцитоз, выраженную относительную лимфопению. [14].

Кроме того, в результате изучения показателей биохимического анализа крови у больных КЭ при поступлении в стационар установлено, что концентрация глюкозы в крови больных ОФ КЭ с благоприятным или летальным исходом была значительно выше, по сравнению с больными, имеющими другие клинические формы этого заболевания. Помимо этого, установлена тенденция к росту активности АЛТ и АСТ в крови больных ОФЛИ, что, в совокупности, характеризуется нарастанием интоксикации и оксидативного стресса. В доступной отечественной литературе, посвященной КЭ, имеются лишь единичные сообщения, касающиеся изменению биохимических показателей у больных КЭ. В работе А. А. Теслина [62] упоминается, что в крови больных МФ и ОФ КЭ значительно увеличивается активность АЛТ и АСТ, а также концентрация билирубина, по сравнению с ЛФ КЭ, что может указывать на снижение детоксикационной функции печени. Кроме того, по данным иностранных источников, известно, что тяжелое течение флавивирусных энцефалитов

различной этиологии, включая КЭ, Японский энцефалит [168, 175], ЛЗН [73,97, 138142, 159] и осложненную геморрагическую лихорадку денге [98], часто сопровождается повышением содержания в сыворотке креатинина, АСТ, а в некоторых случаях – АЛТ и общего билирубина.

Известно, что гипергликемия и сахарный диабет ассоциированы с тяжелым течением и возможными неблагоприятными исходами бактериальных менингитов [150] и вирусных менингоэнцефалитов [97, 138, 142, 159]. В частности, в эксперименте на модели сахарного диабета у мышей, зараженных вирусом лихорадки Западного Нила (ЛЗН), одним из флавивирусов, близкородственных вирусу КЭ, доказано более частое развитие тяжелого поражения головного мозга, коррелирующего с более активной репликацией вируса ЛЗН и усилением воспалительного ответа и окислительного стресса, по сравнению с контрольной группой животных, не имеющих диабета [121, 153].Известно, что гипергликемия может приводить к дисфункции ГЭБ, что сопровождается изменением транспортно-обменной функций ГЭБ (например, в отношении глюкозы, инсулина, холина, аминокислот, электролитов и др.), активации окислительного стресса, дефектам целостности системы микрокапилляров ГЭБ, ишемии головного мозга и повышению проницаемости ГЭБ для вирусов и бактерий [103].

Кроме того, известно, что различные бактериальные осложнения, включая нозокомиальную инфекцию, довольно часто встречаются у больных с тяжелыми вирусными менингоэнцефалитами [73] при наличии сопутствующего сахарного диабета [103]. Этот факт нашел подтверждение в исследовании: в микробиологическом посеве материала из носоглотки у пациентов с ОФЛИ обнаружены различные виды условно-патогенных бактерий (*Streptococcus viridans, Str. pyogenes, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae и др.*). Прогностически неблагоприятным признаком летального исхода заболевания можно считать обнаружение бактерий *Pseudomonas spp., Klebsiella spp.*, которые в группе больных ОФЛИ вызывали внутрибольничную долевую пневмонию и острый

энтероколит. Основной причиной смерти больных ОФ был острый респираторный дистресс-синдром взрослых с отеком легких.

Полученные нами данные во многом сходны с результатами В. Г. Мирошниченко с соавт. [57], которые у большинства больных ОФ с летальным исходом на 3-4 день от начала болезни наблюдали угнетение сознания вплоть до сопора или комы, развитие бульбарного синдрома и прогрессирующих дыхательных нарушений. У некоторых больных ОФ с летальным исходом, также как и в обследованной нами группе пациентов с ОФЛИ, уже в первые дни болезни был выявлен гнойно-деструктивный процесс в легких в виде абцессов и пневмонии [57]. В результате бактериологического исследования этим авторам удалось выделить из воспалительных очагов легочной ткани условно-патогенные бактерии (энтерококки, вульгарный протей и стафилококки) [57]. Поэтому появление признаков пневмонии следует рассматривать как неблагоприятный прогностический признак течения ОФ КЭ. Кроме того, у обследованных нами больных ОФЛИ был диагностирован острый энтероколит, некротический нефроз, миокардит, что подтверждалось не только данными электрокардиограммы, но и повышением выше нормы и нарастанием в динамике АСТ, общей и МВ-фракции креатинкиназы. Все это может свидетельствовать о полиорганной недостаточности у больных ОФ с летальным исходом, что нашло свое отражение в изменении показателей биохимического анализа крови.

Анализ различных параметров ликвора при поступлении больных в стационар позволил установить, что значения показателей плеоцитоза и числа лимфоцитов в ликворе у больных ОФ были ниже, чем у больных МФ, что, по-видимому, связано с отсутствием или незначительной выраженностью менингеального воспаления участи обследованных нами больных ОФ, у которых был диагностирован полиоэнцефаломиелитический, а не менингоэнцефалитический вариант заболевания. Вместе с тем, в группе больных ОФЛИ число нейтрофилов в ликворе напротив было значительно выше, чем у больных МФ, в то время как уровень плеоцитоза не имел достоверных отличий между этими группами.

Некоторые авторы сообщают о менее выраженном плеоцитозе у больных ОФ, чем в группе с МФ КЭ [50], что полностью совпадало с полученными нами данными. Однако большинство других исследователей обнаружили значительно более высокий уровень нейтрофильного или смешанного плеоцитоза и гиперпротеинархии у больных ОФ, по сравнению с больными МФ КЭ, у которых доминировал лимфоцитарный плеоцитоз и гипопротеинархия [14, 22,27, 30, 52].

Таким образом, по-видимому, подобные расхождения могут быть обусловлены различиями в вариантах течения ОФ КЭ (менингоэнцефалитический, полиоэнцефаломиелитический, полиомиелитический и др.) между обследованными группами и зависели от наличия воспаления мозговых оболочек у больных, имеющих очаговую симптоматику.

4.4 Иммунологические прогностические критерии клинических форм клещевого энцефалита

В проведенном нами исследовании показано, что продукция провоспалительных цитокинов ИФ-α, ИФ-γ, ФНО-α, а также показатель соотношения концентраций ФНО-α/ИЛ-4 в супернатантах культур клеток больных вне зависимости от клинической формы КЭ значительно выше, чем в контрольной группе, что свидетельствует о поляризации иммунного ответа по пути Т-хелперов (Th)-типа 1 у больных КЭ. На это же указывает то, что продукция провоспалительного цитокина ФНО-α и значения показателя ФНО-α/ИЛ-4 достигали максимальных значений у больных ОФ и оказались существенно выше, по сравнению с соответствующими значениями у больных ЛФ и МФ заболевания. В полученных нами данных, в отличие от результатов Н. В. Крыловой с соавт. [33], у больных ОФ КЭ с благоприятным исходом продукция ФНО-α в культурах мононуклеарных клеток сохранялась на повышенном уровне, по сравнению с больными МФ и ЛФ заболевания, что проявлялось также в росте соотношения концентраций ФНО-α/ИЛ-4. Кроме того, установлено,что у больных МФ КЭ продукция противовоспалительного цитокина

ИЛ-4 в супернатантах культур мононуклеарных клеток была статистически значимо выше, чем в контроле, в то время как у пациентов с ОФ или ЛФ не отличалась от средних значений у здоровых доноров.

Продукция ИФ-α и ИФ-γ, в супернатантах культуры крови обследованных нами больных МФ и, в особенности, ОФ оказалась значительно ниже, чем у больных ЛФ, что может быть связано со снижением функциональной активности Т-клеток и совпадало с результатами большинства авторов [28, 33]. Снижение секреции иммунокомпетентными клетками интерферонов, свидетельствовует о нарушении противовирусной защиты организма у этой группы больных [28, 53, 58]. Известно, что интерфероны ИФ-α/β и ИФ-γ имеют очень важное значение в формировании адекватного иммунного ответа при инфекциях различными флавивирусами [128, 161]. Подавление продукции интерферонов в инфицированных вирусом КЭ человеческих моноцит-дендритных клетках приводит к активизации репликации вируса [128, 161].

Также как и другие исследователи, мы обнаружили повышение продукции ИЛ-10 в культурах мононуклеарных клеток, полученных от больных ОФ с благоприятным исходом, по сравнению с пациентами, имевшими другие клинические формы болезни, что, по-видимому, отражает направленность этого цитокина на подавление избыточной продукции провоспалительных цитокинов и ограничение воспалительной реакции с развитием компенсаторного противовоспалительного ответа (CARS) в этой группе больных [5, 14,28, 33, 52]. Известно, что чрезмерная продукция провоспалительных цитокинов может способствовать повышению проницаемости ГЭБ для вирусов, что может предрасполагать к развитию МФ и ОФ КЭ [172].

Цитокиновый статус больных КЭ в настоящее время изучен несколькими авторами, не в полном объеме и в основном с использованием оценки концентраций цитокинов в сыворотке крови больных, а не в супернатантах культур мононуклеарных клеток[5, 28, 32, 33, 61]. Ряд авторов сообщает о значительном снижении концентрации провоспалительных цитокинов, включая интерфероны (ИЛ-8, ИЛ-18, ИЛ-1β, ИФ-α и др.), в сыворотке крови больных ОФ

с благоприятным исходом заболевания [28, 33]. Вместе с тем, по данным этих авторов летальный исход у больных ОФ характеризуется резким снижением резервного потенциала иммунокомпетентных клеток с одновременной дисфункцией системы цитокинов активационного типа, включая гиперпродукцию провоспалительных цитокинов, в особенности ИЛ-8, ИЛ-18, ИЛ-1β и ФНО-α, а также максимальными значениями соотношения концентраций ФНО-α/ИЛ-4. Эти изменения иммунного ответа у больных КЭ с летальным исходом авторы объясняют доминированием синдрома системного воспалительного ответа (SIRS), который сопровождался гиперпродукцией провоспалительных цитокинов [15, 33, 81].

Изучение цитокинового статуса у больных ОФ с летальным исходом в нашей работе не проводилось.

Расхождения в значениях цитокиновых реакций могут быть связаны с различиями в методиках (изучение концентрации цитокинов в сыворотке крови и определение спонтанной продукции в супернатантах культур), а также в сроках взятия материала на исследование от начала заболевания, поскольку в случае проведенного нами исследования кровь для получения культур была получена в первые дни болезни.

В отличие от других исследователей, мы впервые проанализировали результаты изучения показателя отношения шансов (ОШ) для различных показателей цитокинового статуса, которые показывают во сколько раз шанс иметь изучаемый признак в группе больных ОФ больше, чем в группе с МФ КЭ. Установлено, что высокое прогностическое значение для диагноза ОФ КЭ продемонстрировали значения продукции ИФ-α ниже 20 пг/мл, ИФ-γ ниже 15 пг/мл, ИЛ-10 выше 28 пг/мл, ФНО-α выше 43 пг/мл и соотношения ФНО-α/ИЛ-4 больше 11.

4.5 Характеристика цитогенетических нарушений и показателей окислительного стресса у больных клещевым энцефалитом

В настоящее время, установлено, что окислительный стресс при вирусных инфекциях, вызванных РНК-содержащими вирусами, может способствовать нескольким аспектам патогенеза, включая повреждение клеточной ДНК и инициации апоптоза различных типов клеток, подавление пролиферации Т-лимфоцитов, иммунодефициту, воспалительной реакции и т.п. [126, 155, 164]. Малоновый диальдегид (МДА) является важным маркером активности окислительного стресса, эндогенной интоксикации и повреждения клеточных мембран и тканей [84, 135]. Установлено, что МДА, является не только промежуточным продуктом ПОЛ, но и высокореактивным соединением, взаимодействующим с макромолекулами, включая ДНК, что ведет к генотоксическому и мутагенному действию [135].

В настоящее время установлено, что МДА и некоторые другие реактивные продукты ПОЛ являются маркерами не только повреждения ДНК в виде точечных мутаций, но имеют прямую корреляцию со структурными хромосомными аберрациями в клетках и образованием микроядер (МЯ) [108]. Показано, что кластогенные нарушения, видимые в цитологических препаратах как хромосомный разрыв или МЯ, демонстрируют, что антиоксидантная защита и система репарации ДНК перегружены [108].

В настоящее время рядом авторов доказано существенное повышение продукции МДА и метаболитов оксида азота у больных с различными клиническими формами КЭ, что сопровождается значительным угнетением антиоксидантной антирадикальной системы защиты [31, 44, 135, 176]. В исследовании W. Łuczaj с соавт. [176] установлено, что у больных КЭ, по сравнению с контрольной группой здоровых лиц, существенно снижена активность глутатион пероксидазы и других антиоксидантных факторов, при одновременном значительном увеличении МДА в ликворе и сыворотке крови, что, по-видимому, играет важную роль в патогенезе этой инфекции. Установлено,

что наиболее высокие концентрации МДА и других продуктов ПОЛ обнаружены у больных очаговой формой КЭ [44].

В проведенном нами исследовании впервые изучены взаимосвязи между концентрацией малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови, продукцией провоспалительных цитокинов (ФНО-α), а также частотой клеток с цитогенетическими нарушениями (маркеров хромосомных аберраций и повреждения ДНК в клетках) с использованием двух методов: определением числа клеток буккального эпителия с микроядрами (МЯ) ичастоты бинуклеарных цитокинез-блокированных Т-лимфоцитов с МЯ в периферической крови у больных с различными клиническими формами КЭ.

В результате проведенного нами исследования установлено, что у больных МФ и ОФ концентрация МДА в сыворотке крови, а также уровни клеток буккального эпителия с МЯ или лимфоцитов с МЯ значительно выше не только, чем в контроле, но и по сравнению с пациентами ЛФ этой инфекции. У больных КЭ нами впервые выявлена прямая корреляционная зависимость между частотой клеток буккального эпителия с МЯ или лимфоцитов с МЯ и концентрацией МДА в сыворотке крови, а также между продукцией ФНО-α в супернатантах культур или соотношением ФНО-α/ИЛ-4 и содержанием МДА в сыворотке крови больных КЭ, что свидетельствует о тесной взаимосвязи активности окислительного стресса и повреждения ДНК.

Известно, что маркер эндогенной интоксикации ФНО-α отвечает за увеличение микробицидности гранулоцитов, стимулирует апоптоз клеток через CD95+-рецепторы, продукцию нейтрофилами пероксида водорода и других ROS, а также синтез острофазных белков [40, 82]. Взаимозависимость между повышенной продукцией ФНО-α и концентрацией МДА в сыворотке крови отмечали в своих работах большое число авторов при некоторых других вирусных инфекциях, например, при цитомегаловирусной инфекции [18] лихорадке денге [77] или при хроническом вирусном гепатите С [152]. Корреляционные зависимости между числом хромосомных аберраций в

лимфоцитах периферической крови и концентрацией МДА в сыворотке крови установлены у больных ВИЧ-инфекцией [108].

Нами впервые установлено, что высокое прогностическое значение для диагноза ОФ КЭ имеют значения показателей МДА выше 6,0 мкмоль/л, число клеток буккального эпителия с МЯ более 6 ‰ и частота бинуклеарных Т-лимфоцитов с МЯ в периферической крови более 9 ‰.

Интересно отметить, в результате проведенного нами исследования показано, что большинство больных с наиболее тяжелой очаговой формой КЭ, в особенности в случае летального исхода имели сахарный диабет 2-го типа, ГБ, ИБС и/или ожирение. Известно, что сахарный диабет и гипергликемия ассоциированы с активацией окислительного стресса, развитием хронического воспаления, повышением продукции реактивных форм кислорода и азота и с экспрессией провоспалительных цитокинов, что может приводить к ишемии головного мозга и к острому нарушению мозгового кровообращения [92]. В эксперименте у животных, инфицированных вирусом ЛЗН показано, что у животных с сахарным диабетом вирус ЛЗН более интенсивно размножается в головном мозге, что связано с Т-клеточным иммунодефицитом и со снижением миграции CD45+ лейкоцитов и CD8+Т-лимфоцитов через ГЭБ в головной мозг, приводящим к подавлению противовирусного иммунного ответа, активации продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ФНО-α, ИЛ-6, ИФ-γ) и усилению воспалительного повреждения нейронов в головном мозге [155].

В исследованиях, на примере ожирения, предиабета, сахарного диабета и метаболического синдрома с использованием микроядерного теста в лимфоцитах периферической крови показано, что при этих заболеваниях не только повышена активность окислительного стресса, что проявляется в значениях МДА в сыворотке крови, но и увеличена частота лимфоцитов с МЯ [74, 104, 106]. Показано, что у больных с гипергликемией частота клеток с МЯ прямо коррелирует с концентрацией гликированного гемоглобина в крови [104]. Эти данные свидетельствуют о том, что у пациентов с метаболическим синдромом и сахарным диабетом существует взаимосвязь между

Т-клеточнымиммунодефицитом, увеличением уровня повреждения ДНК и активностью окислительного стресса [106], что, по нашему мнению, может способствовать развитию ОФ КЭ и увеличивать риск летального исхода при этой инфекции.

Установлено, что общим механизмом косвенного эндогенного повреждения ДНК при всех инфекциях, вызванных РНК-содержащими вирусами, является повышенная генерация реактивных метаболитов кислорода (ROS) и оксида азота (NO), приводящая к окислительному стрессу [143, 155, 182]. Известно, что окислительный стресс в очагах воспаления приводит к точковым мутациям типа трансверсий (заменам нуклеотидов) в результате ошибок ДНК полимераз в ходе репликации ДНК [105, 156, 186]. Накопление такого рода мутаций в дальнейшем приводит к остановке клеточного цикла, а ошибки ферментов ДНК-репарации индуцируют одно- или двунитевые разрывы ДНК, результатом которых является появление хромосомных или хроматидных структурных аберраций и микроядер в хромосомных и цитологических препаратах [131].

Установлено, что вирус КЭ и некоторые другие родственные вирусы, например, вирус Японского энцефалита, вызывают повреждение ДНК и хромосомные аберрации, что впервые установлено ещё в 70-е годы прошлого столетия и нашло подтверждение в дальнейших исследованиях [17,54, 69, 70]. Авторами высказано предположение, что подобные цитогенетические аберрации в иммунокомпетентных клетках могут явиться причиной их функциональных нарушений, а также способны инициировать апоптоз Т-лимфоцитов, приводящий к иммунодефициту и нарушению противовирусного ответа. Однако, в отличие от проведенного нами исследования, до сих пор, не проводилось изучение зависимости между уровнем цитогенетических нарушений и клиническими формами и/или степенью тяжести КЭ. Учитывая тот факт, что КЭ сопровождается повышением образования МДА и других продуктов ПОЛ при одновременном снижении активности глутатионпероксидазы и других антиоксидантных факторов [180],можно предположить, что окислительный стресс является наиболее важным

механизмом повреждения ДНК и цитогенетических нарушений при этой инфекции.

Кроме того, нами впервые показана высокая эффективность использования микроядерного теста в лимфоцитах периферической крови и/или эпителиальных клетках буккального эпителия для определения цитогенетических последствий острого КЭ. Микроядром (МЯ) называют небольшие хроматиновые структуры в цитоплазме клетки, состоящие из отставшей целой хромосомы или её фрагмента, которые образуются на стадии митоза в результате различных типов хромосомных аберраций [102, 142]. Известно, что образование МЯ может происходить спонтанно, однако, в присутствии определенных эндогенных или экзогенных факторов, частота клеток с МЯ значительно увеличивается [180]. Повышение частоты клеток с МЯ у человека служит надежным биомаркером геномной нестабильности, мутагенного и генотоксического воздействия [60, 124, 142, 147,177, 180]. Доказана прямая связь между окислительным стрессом и индуцируемыми им повреждениями ДНК и частотой МЯ в лимфоцитах периферической крови и в буккальных клетках [120, 148, 171], что также нашло своё подтверждение в нашей работе на примере больных КЭ.

4.6 Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1* и *GSTT1*

Известно, что система глутатиона в сочетании с группами ферментов глутатионпероксидаз и глутатион-S-трансфераз является эффективной ловушкой свободных радикалов и играет важную роль в детоксикации ксенобиотиков, что может приводить к значительному снижению повреждающих эффектов окислительного стресса [34, 163, 178]. Малоновый диальдегид (МДА) и другие продукты ПОЛ реагируют с антиоксидантами, такими как глутатион (GSH) и глутатионпероксидаза, которые участвуют в подавлении активности окислительного стресса [136]. Поэтому показано, что снижение активности системы глутатиона может приводить к накоплению свободных радикалов,

усугублять развитие окислительного стресса и вызывать повреждение клеток и тканей при различных заболеваниях [39, 55].

В результате проведенного исследования нами впервые проанализирована в динамике частота клеток с цитогенетическими нарушениями у больных ЛФ КЭ в острый и реконвалесцентный периоды болезни в зависимости от вариантов генов глутатион-S-трансферазы *GSTM1* и *GSTT1* в генотипе больного.

Гены *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1* кодируют класс ферментов глутатион-S-трансфераз (GST), которые катализируют присоединение трипептида глутатиона к электрофильному центру разнообразных соединений, что приводит образованию более гидрофильных и менее токсичных продуктов [86]. Глутатион-S-трансферазы (GST) являются важной частью системы защиты от широкого круга потенциально опасных химических соединений. *GSTP1*, *GSTT1* и *GSTM1* в основном участвуют в реакциях детоксикации канцерогенных промежуточных продуктов лекарственных препаратов, тяжелых металлов, полиароматических углеводородов, супероксид-анион радикала кислорода, продуктов перекисного окисления липидов, продуцируемых в реакциях с участием системы цитохрома P450 (*CYP*) [86]. Глутатион-S-трансферазы (GST) обладают пероксидазной активностью, благодаря чему играют важную роль во внутриклеточном связывании и транспорте большого числа эндогенных и экзогенных соединений [85, 144]. Установлено, что полиморфизм генов GST может влиять на уровень повреждений ДНК, вызванных рядом мутагенных и/или канцерогенных соединений эндогенного и экзогенного происхождения, и тесно связан с индивидуальной восприимчивостью к этим веществам [36, 85, 144].

Известно, что гены *GSTM1* и *GSTT1* могут иметь относительно протяженные делеции, приводящие к утрате функционирования этих генов, которые обычно обозначают как «нулевые» аллели *GSTM1* (0/0) или *GSTT1* (0/0) [36, 85]. Такие мутации ассоциированы с отсутствием продукции соответствующих ферментов, что приводит к значительному повышению повреждающего действия мутагенов, в том числе реактивных форм кислорода и оксида азота на ДНК. Встречаемость таких делеций в популяциях очень высока,

поскольку установлено, что до половины европеоидного населения являются гомозиготами по делеции гена *GSTM1* и около 15% по делеции гена *GSTT1* [68, 100].

В настоящее время показано, что полиморфизм генов *GSTM1* и *GSTT1*, связанный с делецией этих генов играет важную роль в повышенном риске некоторых типов рака, включая рак желудка, мочевого пузыря, лейкозов [2, 43, 78, 80], а также тяжелого течения инфекционных заболеваний, таких как туберкулез, малярия, ВИЧ-инфекция и геморрагическая лихорадка с почечным синдромом [51, 59, 107, 119].

Во многих исследованиях доказана связь между носительством делеций *GSTM1* и/или *GSTT1* и значительным повышением уровня клеток с повреждениями ДНК и/или цитогенетических нарушений, включая частоту клеток с микроядрами (МЯ), что связывают как с эффектами некоторых мутагенов, так и с активацией окислительного стресса. Например, показано, что лица, курящие сигареты и имеющие нефункционирующий «нулевой» аллель гена *GSTM1* и/или *GSTT1*, демонстрируют значительно более высокие уровни повреждений ДНК в различных типах клеток и числа лимфоцитов с хромосомными аберрациями в периферической крови, чем носители нормального аллеля этого гена [125, 144]. В другом исследовании у рабочих бензозаправочных станций, обладающих «нулевыми» генотипами *GSTM1* и/или *GSTT1*, обнаружено значительно более высокое число цитокинез-блокированных лимфоцитов с микроядрами,что связано с хроническим воздействием паров бензина [114].

В проведенном нами исследовании наиболее значительное и длительное (до 3 мес.) повышение частоты клеток с МЯ установлено у больных ЛФ КЭ, являющихся носителями мутантных неактивных аллелей генов *GSTM1*(0/0) и *GSTT1*(0/0), по сравнению с группами больных ЛФ, имевших активные варианты этих генов (*GSTM1*(+)/*GSTT1*(0/0), *GSTM1*(0/0)/*GSTT1*(+) или *GSTM1*(+)/*GSTT1*(+)). Кроме того, полученные нами данные свидетельствуют о том, что выявленное повышение частоты клеток с цитогенетическими нарушениями в обследованной группе больных КЭ зависело, прежде всего, от

присутствия в генотипе больного нулевого аллеля гена *GSTM1*(0/0), а не гена *GSTT1*(0/0).

4.7 Математические модели и формулы для формирования групп риска очаговой формы клещевого энцефалита и прогноза тяжести течения заболевания

С целью формирования групп повышенного риска ОФ КЭ в начальном периоде этой инфекции выявлены основные клинические, эпидемиологические и лабораторные прогностические критерии, а также впервые идентифицированы несколько иммунологических и цитогенетических предикторов течения КЭ с очаговой симптоматикой. На основании полученных данных с применением бинарной логистической регрессии и ROC-анализа построены три математических модели, которые потенциально могут быть использованы врачами скорой помощи или приемного покоя для раннего прогноза ОФ КЭ. В отличие от других авторов, для каждого идентифицированного нами критерия и для всех разработанных моделей определены весовые коэффициенты доказательности и прогностической силы каждого параметра, что позволило исключить все несущественные или избыточные переменные.

Поскольку известно, что очаговая симптоматика у больных ОФ КЭ в 75 % случаев появляется не ранее 4-5 дня болезни [16, 50], то для создания модели ранней дифференциальной диагностики ОФ и МФ КЭ мы использовали данные анамнеза и клиники при поступлении больного в стационар в первую неделю заболевания. На основе анализа рутинных клинико-эпидемиологических данных нами разработаны две взаимодополняющих модели, позволяющие разграничить МФ и ОФ КЭ. В одной модели использовался возраст больного, частота пульса при поступлении больного в стационар, число дней, прошедших от начала заболевания до поступления больного в стационар, а также наличие признаков дезориентации (возбуждения), а в другой модели учитывались такие параметры как нарушение сознания, речи и появление рвоты.

Кроме того, нами предложена модель на основе анализа показателей спонтанной продукции ИЛ-10 в супернатантах культуры мононуклеарных клеток периферической крови, соотношения концентраций ФНО-α и ИЛ-4 в этих супернатантах, а также частоты клеток буккального эпителия с МЯ.

Известно, что различные математические модели потенциально могут быть применены для различных целей в области клинической диагностики ряда инфекционных заболеваний, включая КЭ. В доступной литературе мы нашли несколько математических формул или прогностических критериев, разработанных различными авторами, нацеленных на экспресс-оценку тяжести состояния больного КЭ, прогнозирование различных клинических форм этой инфекции. Однако, в отличие от предложенных нами моделей, ни одна из этих формул не позволяла формировать группы повышенного риска ОФ и МФ КЭ в первые дни заболевания. Кроме того, эти формулы, в отличие от разработанных нами алгоритмов, не предусматривали более удобные с точки зрения практического применения шкалы с системой в условных баллах.

В. В. Проворовой [50] разработаны две модели на основе изученных клинико-эпидемиологических данных с использованием теоремы Байеса и многофакторного дискриминантного анализа. С целью создания математической модели раннего прогноза ОФ КЭ этим автором проанализировано значения 14 эпидемиологических, 36 клинических и 29 лабораторных показателей. Из числа эпидемиологических показателей в этой модели учитывались: возраст, пол заболевших, количество укусов клещей и их локализация на теле, длительность инкубационного периода, наличие вакцинации и экстренной профилактики и ряд других параметров. Клинические параметры включали главным образом, степень выраженности и динамику интоксикационного, общемозгового и менингеального синдромов в течении первых трех дней болезни, а также общеклинические лабораторные методы [50]. Однако, разработанная модель достаточно сложна в практическом применении и, в отличие от предложенных нами алгоритмов, требует использования специальной компьютерной программы. Кроме того, с нашей точки зрения главным недостатком этой и большинства других работ,

посвященных разработке математических моделей для клинической диагностики КЭ, является отсутствие каких-либо данных об оценке прогностической ценности таких алгоритмов или формул.

В работе А. Б. Коньковой-Рейдман [30] с помощью программы STATISTICA 5.0 создана математическая формула прогнозирования прогредиентного (хронического) течения клещевого менингоэнцефалита на основе анализа результатов клинико-лабораторных данных. Общая прогностическая возможность этой формулы составила 85 %, что ниже, чем у предложенных нами диагностических моделей.

В работах Л. И. Волковой [6, 7] проанализировано 26 анамнестических, клинических и лабораторных параметров, из которых выделены 18 показателей неблагоприятного развития ОФ КЭ, включая: возраст больных, отсутствие специфической профилактики (вакцинации или введения противоклещевого иммуноглобулина), признаки прогрессирования заболевания (длительность инкубационного периода, сроки появления очаговых симптомов после начала болезни), состояние соматического статуса пациента, показатели частоты сердечных сокращений, артериального давления, частоты дыхательных движений и температуры, и такие лабораторные данные как число лейкоцитов и лимфоцитов крови, показатель СОЭ и уровень сатурации кислорода в крови. Из параметров неврологического статуса наибольшее значение имели: степень тяжести менингеального синдрома, уровень сознания по шкале Глазго, частота эпилептических припадков, выраженность полиомиелитического и бульбарного синдромов. Кроме того, на основании вышеперечисленных показателей этим автором предложена формула, которая, может быть применена только для оценки степени тяжести ОФ КЭ и отбора пациентов, нуждающихся в интенсивной терапии в условиях отделения реанимации [6, 7]. Разработанные нами модели, в отличие от других диагностических моделей, позволяют прогнозировать риск развития ОФ КЭ в первые дни заболевания.

P. Bogovic с соавт. [87, 151] предложен алгоритм количественной оценки степени тяжести заболевания у больных МФ и ОФ КЭ, используя

стандартизированный опросник. Авторы присвоили определенное количество баллов (от 1 до 9) в зависимости от интенсивности и продолжительности каждого симптома, включая такие признаки как головная боль, лихорадка, рвота, менингеальные знаки, тремор, парезы конечностей, задержка мочи, нарушение сознания и когнитивной функции [156]. В соответствии с количеством набранных баллов больных МФ и ОФ КЭ можно классифицировать на имеющих заболевание легкой, средней и тяжелой степени тяжести [156]. Однако, в отличие от предложенной нами математической модели, эта система также как формула, предложенная Л. И. Волковой [7] может быть применена только для оценки степени тяжести болезни, но не для прогноза риска ОФ КЭ.

В результате проведенных исследований нами впервые продемонстрирована возможность прогноза ОФ у больных КЭ в начальном периоде болезни благодаря использованию математической модели на основе оценки цитокинового статуса и цитогенетических нарушений.

В литературе имеются лишь единичные работы, которые использовали данные иммунного и цитокинового статуса для прогноза тяжести течения КЭ [11, 42]. Вместе с тем, в отличие от нашей модели, никто из авторов ещё не пытался применять цитогенетические показатели для этих целей. Н. В. Ермаковой, И. Л. Мироновым с соавт. [11, 42] разработана прогностическая модель ранней диагностики ЛФ и МФ с помощью методов дискриминативного анализа, деревьев «решений» и логистического регрессионного анализа. Общая прогностическая возможность этой модели составила 94%. В отличие от проведенного нами исследования, эта модель позволяла дифференцировать ЛФ и МФ КЭ и включала 6 информативных предикторов: концентрацию ИЛ-8, ИЛ-10, ИФ-α в сыворотке крови, концентрацию нейроспецифической енолазы в ликворе, а также абсолютное содержание лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови [11, 42].

Таким образом, в отличие от предложенных другими авторами отдельных формул, которые ограничивались только клиническими или только иммунологическими критериями, применением разработанных нами

математических моделей можно варьировать в зависимости от симптоматики у больного, диагностических возможностей врача и лабораторной службы, поскольку они основаны либо на рутинных клинико-эпидемиологических, либо на неиспользуемых в общеклинической практике иммунологических и цитогенетических показателях. Все эти модели показали отличное качество прогностических возможностей. Предложенные нами модели можно легко использовать на практике, поскольку каждая из них не требует сложных подсчетов, хотя потенциально может применяться в виде калькулятора. Кроме того, каждая модель представлена в виде удобной шкалы с количественной оценкой каждого параметра в балльной системе. Разработанные нами модели являются полезным дополнительным инструментом, который может быть использован практическим врачом для формирования групп повышенного риска менингеальной и очаговой форм КЭ в начальном периоде заболевания. Следует подчеркнуть, что эти алгоритмы не предназначены для диагностики клинических форм, определения степени тяжести течения или прогноза исходов болезни. С нашей точки зрения, это направление исследований имеет перспективы дальнейшего совершенствования, конечной целью которых может быть создание более сложных компьютерных моделей позволяющих прогнозировать в начальном периоде риски тяжелого течения не только моноинфекции КЭ, но всевозможных смешанных инфекций, которые характерны для заболеваний, передаваемых клещами.

ВЫВОДЫ

1. Эпидемиологическими и анамнестическими предикторами повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита являются: возраст старше 41 года, локализация укуса клеща в области головы и шеи, поздние сроки госпитализации более 7 дней после начала заболевания, а также наличие более двух фоновых соматических заболеваний, в особенности, сахарного диабета, гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и/или ожирения.

2. Среди клинико-лабораторных данных информативными ранними прогностическими критериями повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита являются тахикардия выше 90 в мин, частота дыхательных движений более 20 в мин, повышение температуры тела выше 39,5 ^{o}C, систолическое и диастолическое давление выше 140 и 90 мм рт. ст. соответственно, появление хотя бы одного из таких признаков, как оглушенность, дезориентация, спутанная речь, рвота, грубая ригидность затылочных мышц, симптомов Кернига и Брудзинского, а также относительная лимфопения, нейтрофильный лейкоцитоз, повышение скорости оседания эритроцитов и увеличение концентрации глюкозы в крови.

3. К наиболее значимым, ранним иммунологическим и цитогенетическим предикторам очаговой формы клещевого энцефалита относятся: существенное повышение продукции в культуре мононуклеарных клеток интерлейкина-10, фактора некроза опухоли-α, соотношения концентраций фактора некроза опухоли-α и интерлейкина-4, а также увеличение содержания малонового диальдегида в сыворотке крови и частоты встречаемости лимфоцитов крови и буккальных клеток с микроядрами.

4. Уровень клеток с цитогенетическими нарушениями у больных клещевым энцефалитом находится в прямой корреляционной зависимости от активности образования продуктов перекисного окисления липидов – малонового диальдегида, секреции провоспалительного цитокина – фактора некроза опухоли-α, а также от присутствия в генотипе больного нефункционирующих вариантов

генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1*(0/0) и/или *GSTT1*(0/0), одной из наиболее важных групп ферментов системы антиоксидантной защиты.

5. Математические модели, разработанные на основе анализа эпидемиологических, клинических, иммунологических и цитогенетических показателей, позволяют формировать в раннем периоде заболевания группы пациентов с повышенным риском развития очаговой и менингеальной форм клещевого энцефалита.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве ранних предикторов повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита до появления очаговых симптомов необходимо принимать во внимание такие признаки, как возраст больного старше 41 года, локализацию присасывания клеща в области головы и шеи, поступление в стационар после 7 дня от начала болезни, наличие более двух фоновых соматических заболеваний, в особенности, сахарного диабета, гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и ожирения, тахикардию более 90 в мин, частоту дыхания более 20 в мин, показатели систолического и диастолического давления более 140 и 90 мм рт. ст. соответственно, повышение температуры тела выше 39,5 ^{o}C, а также появление хотя бы одного из следующих симптомов: оглушенности, дезориентации, спутанной речи, рвоты, грубой ригидности затылочных мышц, симптомов Кернига и Брудзинского.

2. Для формирования групп повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита рекомендовано использовать три математические модели с применением бинарной логистической регрессии и ROC-анализа. Для всех параметров, включенных в модели, приведены шкалы, которые позволяют рассчитать сумму баллов для каждого пациента. Полученный результат вычислений необходимо сравнить со значениями порогов отсечения (COV).

Прогностический риск очаговой формы также может быть рассчитан по формуле:

$$P(X) = \frac{1}{1+e^{-z}},$$

где $z = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \cdots \beta_i X_i$,

где α– константа; β_i – коэффициенты регрессии, рассчитанные в результате логистического регрессионного анализа; X_i – значения независимых переменных.

где α – константа, β_i – коэффициенты регрессии, рассчитанные в результате логистического регрессионного анализа, X_i – значения независимых переменных.

Для модели 1 $z = -1{,}62 + 0{,}009 \times \text{Возраст (годы)} + 0{,}014 \times \text{ЧП (мин)} + 0{,}017 \times \text{ЧД} + 1{,}1 \times \text{Дезориентация}$, где, ЧП – частота пульса, ЧД − число дней, прошедших от начала заболевания до поступления больного в стационар, а параметр «Дезориентация» может принимать значение 0 – при отсутствии симптома и 1 – при наличии симптома.

Для модели 2 $z = -18{,}85 + 20{,}4 \times \text{Нарушение сознания} + 19{,}1 \times \text{Нарушение речи} + 0{,}6 \times \text{Моговая рвота}$, где качественные переменные X_i принимают значение 0 – при отсутствии симптома и 1 – при наличии симптома.

Для модели 3 $z = 0{,}58 + 0{,}038 \times \text{ИЛ10 (пг/мл)} + 0{,}030 \times \text{ФНОальфа / ИЛ4} + 0{,}020 \times \text{Частота буккальных клеток с МЯ (‰)}$.

Следует подчеркнуть, что разработанные прогностические модели могут быть использованы практическими врачами при поступлении больного клещевым энцефалитом в стационар только для формирования групп повышенного риска очаговой формы, но не для определения клинической формы, тяжести течения заболевания или рисков его исхода.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГБ – гипертоническая болезнь

GST – глутатион-S-трансферазы

ГЛПС – геморрагическая лихорадка с почечным синдромом

ГЭБ – гемато-энцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз

ИЛ – интерлейкин

ИФ – интерферон

ИФА – иммуноферментный анализ

ЙА – йодантипирин

КЭ – клещевой энцефалит

ЛЗН – лихорадка Западного Нила

ЛФ КЭ – лихорадочная форма клещевого энцефалита

МДА – малоновый диальдегид

МФ КЭ – менингеальная форма клещевого энцефалита

МЯ – микроядра

ОА –острая антигенемия (вируса клещевого энцефалита)

ОШ – отношение шансов

ОФ КЭ – очаговая форма клещевого энцефалита

ОФЛИ – очаговая форма клещевого энцефалита с летальным исходом

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СОД – супероксиддисмутаза

ФГА – фитогемагглютинин

ФНО-α – фактор некроза опухоли

ЦНС – центральная нервная система

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ATM – англ.ataxia telangiectasia mutated – серин/треониновая протеинкиназа

Ig– иммуноглобулин

HLA-DR – Human Leukocyte Antigens – человеческие лейкоцитарные антигены

NK – натуральные киллеры

NO – оксид азота

ROS – реактивные виды кислорода

ROC-анализ – англ. receiver operating characteristic

SIRS – systemic inflammatory response syndrome – синдром системного воспалительногоответа

Th– Т-хелперы

TLR –Толл-подобный рецептор

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арипходжаева, Г. З. Клинико-патогенетические аспекты побочных эффектов альфа-интерфероновой противовирусной терапии хронического вирусного гепатита С / Г. З. Арипходжаева // Казанский медицинский журнал. – 2014. – Т. 95, № 6. – С. 924–928.

2. Ассоциативное исследование вклада полиморфных локусов генов детоксикации ксенобиотиков в развитие рецидива и лимфогенного метастазирования рака мочевого пузыря / В. Н. Павлов [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 208–213.

3. Безрукова, Е. Г. Роль сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита в этиологии острых и хронических форм заболевания (сопоставление с дальневосточным подтипом) : автореф. дис. … канд. мед.наук / Е. Г. Безрукова. – Москва, 2009. – 26 с.

4. Боровиков, В. П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA : учебное пособие для вузов / В. П. Боровиков. – Москва, 2013. – 288 с.

5. Влияние дисбаланса цитокинов у пациентов с тяжелыми формами клещевого энцефалита на исход заболевания / А. Л. Бондаренко, Е. Л. Контякова, И. В. Зыкова, Е. Г. Тихомолова // Врач-аспирант. – 2011. – Т. 46, № 3–1. − С. 199–205.

6. Волкова, Л. И. Возрастные аспекты эпидемиологии и клиники клещевого энцефалита / Л. И. Волкова, О. П. Ковтун // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2008. – Т. 108, № 10. – С. 61–65.

7. Волкова, Л. И. Клещевой энцефалит на Среднем Урале: клинико-эпидемиологический анализ острых и хронических форм, пути оптимизации оказания специализированной медицинской помощи в эндемичном очаге : автореф. дис. … д-ра мед.наук / Л. И. Волкова. – Екатеринбург, 2009. – 45 с.

8. Гаврилов, В. Б. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой /

В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Л. М. Мажуль // Вопросы медицинской химии. – 1987. – № 1. – С. 118–122.

9. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц ; пер. с англ. Ю. А. Данилова. – Москва : Практика, 1999. – 459 с.

10. Гуляев, С. А. Клещевой энцефалит в Приморском крае / С. А. Гуляев, С. Е. Гуляева, Т. А. Захарычева // Русский журнал детской неврологии. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 25–30.

11. Ермакова, Н. В. Нейроиммунные аспекты патогенеза лихорадочной и менингеальнои форм клещевого энцефалита : автореф. дис. … канд. мед.наук / Н. В. Ермакова. – Санкт-Петербург, 2007. – 22 с.

12. Жукова, Н. Г. Клещевой энцефалит в Томской области (этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика, лечение) / Н. Г. Жукова, Н. И. Команденко, Л. Е. Подоплекина. – Томск :STT, 2002. – 256 с.

13. Значение клинических признаков и их сочетания в ранней диагностике клинической формы клещевого энцефалита / В. В. Проворова, Н. П. Толоконская, Э. А. Спиридонова, Ю. В. Казакова // Бюллетень Сибирской медицины. – 2008. – Прил. 1. – С. 7–11.

14. Значение отдельных цитокинов в патогенезе клещевого энцефалита / А. Л. Бондаренко, Е. Л. Контякова, Е. Г. Тихомолова и др. // Журнал инфекционной патологии. – 2010. – Т. 17, № 3. – С. 31–33.

15. Игнатьев, Г. М. Продукция некоторых цитокинов при экспериментальной инфекции вирусом клещевого энцефалита у мышей / Г. М. Игнатьев, Е. В. Отрашевская, М. С. Воробьева // Вопросы вирусологии. – 2003. – Т. 48, № 1. – С. 18–21.

16. Иерусалимский, А. П. Клещевой энцефалит : руководство для врачей / А. П. Иерусалимский. – Новосибирск, 2001. – 360 с.

17. Ильинских, Н. Н. Влияние вируса клещевого энцефалита на хромосомный аппарат человека / Н. Н. Ильинских, И. Н. Ильинских // Цитология и генетика. – 1976. – Т. 18, № 4. – С. 331–334.

18. Ишутина, Н. А. Малоновый диальдегид и фактор некроза опухолей альфа при цитомегаловирусной инфекции в период беременности / Н. А. Ишутина, Н. Н. Дорофиенко, И. А. Андриевская // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2015. – № 55. – С. 78–81.

19. Казакова, Ю. В. Менингеальная форма клещевого энцефалита: клинические аспекты диагностики и эффективность терапии лейкинфероном : автореф. дис. … канд. мед.наук / Ю. В. Казакова. – Новосибирск, 2007. – 22 с.

20. Клинико-иммунологическая характеристика больных клещевым энцефалитом в острый период в Томской области / И. Н. Удинцева, Н. Г. Жукова, О. Е. Чечина и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 2. – С. 44–50.

21. Клинико-иммунологические аспекты клещевого энцефалита / И. Н. Удинцева, О. Е. Чечина, Н. Г. Жукова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – № 5. – С. 182–189.

22. Клинико-иммунологические прогностические критерии развития очаговых форм клещевого энцефалита / А. Л. Бондаренко, Е. Л. Контякова, Е. Г. Тихомолова и др. // Медицинский альманах. – 2011. – Т. 18, № 5. – С. 228–231.

23. Клинико-лабораторные предикторы прогноза исходов иксодовых клещевых боррелиозов / Н. С. Миноранская, П. В. Сарап, Н. В. Андронова, Е. И. Миноранская // Вестник РАМН. – 2015. – Т. 70, № 3. – С. 378–385.

24. Клинико-эпидемиологическая характеристика клещевого энцефалита в Приморском крае / Е. В. Павленко, Г. Н. Леонова, Л. П. Радченко, О. Н. Борисова // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2010. – № 3. – С. 31–33.

25. Клинико-эпидемиологические особенности клещевого энцефалита на юге Кузбасса / З. А. Хохлова, Р. А. Гилева, Е. В. Захарова и др. // Инфекционные болезни. – 2012. – Т. 10, № 3. – С. 38–43.

26. Клинико-эпидемиологические особенности очаговых форм клещевого энцефалита / О. Н. Любезнова, А. Л. Бондаренко, Е. Л. Контякова и др. // Медицинский альманах. – 2015. – Т. 40, № 5. – С. 156–158.

27. Клиническая характеристика клещевого энцефалита в Кировской области / А. Л. Бондаренко, Е. Л. Контякова, Е. Г. Тихомолова и др. // Инфекционные болезни. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 83–87.

28. Комплексная оценка состояния иммунной системы при различных формах клещевого энцефалита в остром периоде / Н. В. Крылова, Г. Н. Леонова, Е. В. Павленко и др. // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 4–5. – С. 313–320.

29. Контякова, Е. Л. Прогностические критерии течения и исхода тяжелых форм клещевого энцефалита : автореф. дис. … канд. мед.наук / Е. Л. Контякова. – Москва, 2011. – 23 с.

30. Конькова-Рейдман, А. Б. Клинико-эпидемиологическая характеристика клещевого энцефалита на Южном Урале / А. Б. Конькова-Рейдман, В. И. Злобин // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2011. – Т. 103, № 4. – С. 92–95.

31. Конькова-Рейдман, А. Б. Характеристика популяционного спектра лимфоцитов ликвора и медиаторов воспаления при клещевых нейроинфекциях / А. Б. Конькова-Рейдман, В. И. Злобин // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2010. – Т. 99, № 8. – С. 103–106.

32. Крылова, Н. В. История и перспективы изучения иммунологических аспектов патогенеза клещевого энцефалита / Н. В. Крылова // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2007. – № 11. – С. 46–51.

33. Крылова, Н. В. Клеточные и молекулярные механизмы противовирусной защиты при клещевом энцефалите : автореф. дис. … д-ра биол. наук / Н. В. Крылова. – Москва, 2014. – 49 с.

34. Кулинский, В. И. Система глутатиона / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55, № 3. – С. 255–277.

35. Лакин, Г. Ф. Биометрия : учебное пособие / Г. Ф. Лакин. – Москва : Высшая школа, 1980. – 293 с.

36. Леготкин, А. Н. Исследование генов GSTP1, GSTT1, GSTM1 / А. Н. Леготкин, А. Б. Лопатина // Успехи современной науки. – 2016. – Т. 2, № 9. – Р. 23–25.

37. Летальные исходы клещевого энцефалита, вызванного сибирским подтипом возбудителя в Европейской части России и на Урале / В. В. Погодина, Л. С. Левина, Л. С. Карань, Н. М. Колясникова // Медицинская вирусология : труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН. – 2009. – Т. 26. – С. 121–122.

38. Любезнова, О. Н. Эпидемиология клещевых инфекций на севере Волго-Вятского региона / О. Н. Любезнова, А. Л. Бондаренко // Медицинский альманах. – 2013. – Т. 26, № 2. – С. 113–117.

39. Малоновый диальдегид и система глутатиона в крови у больных хроническим панкреатитом в зависимости от длительности заболевания / Н. И. Меринова, Н. М. Козлова, Л. С. Колесниченко и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 67–69.

40. Маржохова, М. Ю. Малоновый диальдегид и фактор некроза опухоли α как показатели синдрома интоксикации при рожистом воспалении / М. Ю. Маржохова, М. М. Афашагова, А. Р. Маржохова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 5. – С. 20–22.

41. Мельникова, О. В. Связь манифестных случаев клещевого вирусного энцефалита с некоторыми демографическими, социальными и экологическими факторами / О. В. Мельникова, Е. И. Андаев // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Т. 77, № 4. – С. 37–45.

42. Миронов, И. Л. Биохимические маркеры клинических форм клещевого энцефалита: верификационная значимость определяемых показателей / И. Л. Миронов, Л. И. Ратникова, Н. В. Ермакова // Известия высших учебных заведений. Уральский регион. – 2013. – № 4. – С. 129–134.

43. Овсепян, В.А. Анализ полиморфизма генов цитохрома P4501A1, глутатион-S-трансфераз M1 и T1 при хроническом миелолейкозе / В. А. Овсепян, Е. Ю. Виноградова, Е. С. Шерстнева // Генетика. – 2010. – Т. 46, № 10. – С. 1360–1362.

44. Оксидативный стресс у больных клещевым энцефалитом на Дальнем Востоке Российской Федерации / Т. А. Захарычева, Ю. Г. Ковальский,

О. А. Лебедько, Т. В. Мжельская // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2012. – № 20. – С. 41–45.

45. Павленко, Е. В. Клинико-эпидемиологический анализ клещевого энцефалита в Приморском крае / Е. В. Павленко, Г. Н. Леонова, Л. П. Радченко // Дезинфекционное дело. – 2010. – № 1. – С. 27–30.

46. Патоморфоз клещевого энцефалита в Кировской области / О. Н. Любезнова, А. Л. Бондаренко, Е. О. Утенкова, Е. Л. Контякова // Инфекционные болезни. – 2015. – Т. 13, № 1. – С. 39–45.

47. Пеньевская, Н. А. Экстренная профилактика клещевого энцефалита с помощью гомологичного специфического иммуноглобулина: теория и практика / Н. А. Пеньевская, В. И. Злобин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – Т. 70, № 3. – С. 81–89.

48. Плехова, Н. Г. Физиологическая роль оксида азота при инфекционном процессе / Н. Г. Плехова, Л. М. Сомова // Успехи физиологических наук. – 2012. – Т. 43, № 3. – С. 62–81.

49. Полиморфизм генов 2'-5'-олигоаденилатсинтетаз (*OAS*) человека, связанный с предрасположенностью к тяжелым формам клещевого энцефалита, в популяциях Северной Евразии / А. В. Бархаш, В. Н. Бабенко, В. Ф. Кобзев и др. // Молекулярная биология. – 2010. – Т. 44, № 6. – С. 985–993.

50. Проворова, В. В. Значение эпидемиологических и клинических данных в раннем прогнозе при клещевом энцефалите : автореф. дис. … канд. мед.наук / В. В. Проворова. – Новосибирск, 2010. – 23 с.

51. Прогностическая значимость полиморфизма генов ферментов детоксикации у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом / Г. М. Хасанова, А. В. Тутельян, Д. А. Валишин, А. Н. Хасанова // Журнал инфектологии. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 73–78.

52. Прогностическое значение иммунорегуляторных Th1- и Th2-цитокинов при клещевом энцефалите / А. Л. Бондаренко, Е. Л. Контякова, Е. Г. Тихомолова и др. // Инфекционные болезни. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 28–32.

53. Ратникова, Л. И. Клинико-иммунологические особенности и критерии прогнозирования течения клещевого энцефалита / Л. И. Ратникова, Л. В. Тер-Багдасарян, Н. В. Печенкина // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2014. – Т. 9, № 4. – С. 21–24.

54. Роль нарушения регуляции апоптотической гибели в механизмах развития вирусиндуцированной цитогенетической нестабильности лимфоцитов крови / Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, О. Б. Жукова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 5. – С. 544–548.

55. Система глутатиона в эритроцитах и плазме крови при вирусных гепатитах / В. И. Кулинский, З. А. Леонова, Л. С. Колесниченко и др. // Биомедицинская химия. – 2007. – Т. 53, № 1. – С. 91–98.

56. Современная эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Челябинской области / С. В. Лучинина, О. Н. Степанова, В. В. Погодина и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – № 2. – С. 32.

57. Соматические осложнения очаговой формы клещевого энцефалита / В. Г. Мирошниченко, В. Д. Смирнов, А. В. Субботин, В. А. Семенов // Клиническая неврология. – 2010. – № 1. – С. 25–26.

58. Стенько, Е. А. Состояние клеточного и гуморального иммунитета при инфицировании вирусом семейства Flaviviridae / Е. А. Стенько, Л. И. Ратникова, Н. В. Ермакова // Известия высших учебных заведений. Уральский регион. – 2013. – № 2. – С. 138–144.

59. Степанова, Н. А. Синдром интоксикации у больных туберкулезом легких в зависимости от полиморфизма генов системы глутатионтрансфераз / Н. А. Степанова, Х. М. Галимзянов, Б. И. Кантемирова // Журнал инфектологии. – 2017. – Т. 9, № 2. – С. 13–16.

60. Сычева, Л. П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека / Л. П. Сычева // Гигиена и санитария. – 2012. – № 6. – С. 68–72.

61. Тер-Багдасарян, Л. В. Прогностическое значение иммунологических показателей в ранней дифференциальной диагностике клинических форм клещевого энцефалита : автореф. дис. … канд. мед.наук / Л. В. Тер-Багдасарян. – Челябинск, 2002. – 22 с.

62. Теслин, А. А. Некоторые аспекты синдрома эндогенной интоксикации при клещевом энцефалите : автореф. дис. … канд. мед.наук / А. А. Теслин. – Новосибирск, 2004. – 20 с.

63. Тяжелый случай клещевого энцефалита у подростка / Е. О. Утенкова, О. Н. Любезнова, Л. В. Малкова, Н. Д. Майорова // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2016. – Т. 95, № 2. – С. 189–192.

64. Утенкова, Е. О. Возрастные особенности клиники клещевого энцефалита / Е. О. Утенкова // Журнал инфекционной патологии. – 2010. – Т. 17, № 3. – С. 137–139.

65. Утенкова, Е. О. Исходы клещевого энцефалита на севере Волго-Вятского региона / Е. О. Утенкова // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2012. – № 20. – С. 45–50.

66. Утенкова, Е. О. Особенности эпидемиологии клещевого энцефалита на севере Волго-Вятского региона / Е. О. Утенкова, О. Н. Любезнова // Национальные приоритеты России. – 2011. – Т. 5, № 2. – С. 94–96.

67. Утенкова, Е. О. Течение клещевого энцефалита у лиц пожилого возраста / Е. О. Утенкова // Неврологический журнал. – 2014. – Т. 19, № 3. – С. 32–35.

68. Филиппова, И. Н. Анализ делеции гена *GSTM1* в контексте гаплотипического разнообразия геномного кластера *GSTM* в трех русских популяциях / И. Н. Филиппова, А. В. Хрунин, С. А. Лимборская // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2014. – № 2. – С. 8–12.

69. Цитогенетика лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистенцией вируса клещевого энцефалита / В. В. Новицкий, О. Б. Жукова, Н. В. Рязанцева и др. // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2003. – Т. 23, № 4. – С. 66–69.

70. Цитогенетическая характеристика культур клеток головного мозга мышей-сосунков, хронически инфицированных вирусом Японского энцефалита / Г. Р. Михайлова, В. И. Гаврилов, Л. П. Горшунова, М. Б. Петухова // Цитология. – 1975. – Т. 17, № 4. – С. 458–463.

71. Частота полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков *CYP1A1*, *GSTM1* и *GSTT1* у жителей города Москвы / С. А. Григорьева, В. А. Никитина, Н. В. Косякова и др. // Медицинская генетика. – 2007. – № 3. – С. 38–43.

72. Эпидемиологическая ситуация по клещевому энцефалиту в Томской области (2007-2009 гг.) / Удинцева И. Н., Полторацкая Т. Н., Шихин А. В. и др. // Вестник УГМА. – 2010. – № 21. – С. 208 – 209.

73. A case of central nervous system infection due to West Nile Virus lineage-1 in Ankara province, Turkey / M. Ocal [et al.] // Mikrobiyol. Bul. – 2013. – Vol. 47, N 1. – P. 164–172.

74. Al-Aubaidy, H. A. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus / H. A. Al-Aubaidy, H. F. Jelinek // Eur. J. Endocrinol. – 2011. – Vol. 164, N 6. – P. 899–904.

75. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans / S. Bonassi, A. Znaor, M. Ceppi et al. // Carcinogenesis. – 2007. – Vol. 28, N 3. – P. 625–631.

76. Antioxidant defense in patients with chronic viral hepatitis B and C type / E. S. Namiduru, M. Namiduru, M. Tarakçioğlu, A. Toy // Clin. Lab. – 2010. – Vol. 56, N 5–6. – P. 207–213.

77. Association between proinflammatory cytokines and lipid peroxidation in patients with severe dengue disease around defervescence / R. Soundravally, S. L. Hoti, S. A. Patil et al. // Int. J. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 18. – P. 68–72.

78. Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) with bladder cancer susceptibility / M. R. Safarinejad, S. Safarinejad, N. Shafiei, S. Safarinejad // Urol. Oncol. – 2013. – Vol. 31, N 7. – P. 1193–1203.

79. Association of *IL28B* and *IL10* gene polymorphism with predisposition to tick-borne encephalitis in a Russian population / A. V. Barkhash, V. N. Babenko, M. I. Voevoda, A. G. Romaschenko // Ticks and Tick-borne Diseases. – 2016. – Vol. 7, N 5. – P. 808–812.

80. Association of the Glutathione S-transferase T1 Null Genotype with Risk of Gastric Cancer: a Meta-analysis in Asian Populations / Y. Zeng, J. Bai, L. C. Deng et al. // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2016. – Vol. 17, N 3. – P. 1141–1148.

81. Atrasheuskaya, A.V. Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis / A. V. Atrasheuskaya, G. M. Ignatyev, T. M. Fredeking // Clinical and Experimental Immunology. – 2003. – Vol. 131, N 1. – P. 148–154.

82. Babbar, N. Tumor necrosis factor-alpha increases reactive oxygen species by inducing spermine oxidase in human lung epithelial cells: a potential mechanism for inflammation-induced carcinogenesis / N. Babbar, R. A. Casero // Cancer research. – 2006. – Vol. 66. – P. 11125–11130.

83. Belikov, A. V. T cells and reactive oxygen species [Electronic resource] / A. V. Belikov, B. Schraven, L. Simeoni // J. Biomed. Sci. – 2015. – Vol. 22. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4608155.

84. Bel'skaya, L. V. Endogenous Intoxication and Saliva Lipid Peroxidation in Patients with Lung Cancer [Electronic resource] / L. V. Bel'skaya, V. K. Kosenok, G. Massard // Diagnostics (Basel). – 2016. – Vol. 6, N 4. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5192514.

85. Bigatti, M. P. Glutathione S-transferase T1 (*GSTT1*) and M1 (*GSTM1*) polymorphisms in a sample of the population in Northern Italy / M. P. Bigatti, A. Santovito // Genetika. – 2007. – Vol. 43, N 6. – P. 827–830.

86. Board, P. G. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology / P. G. Board, D. Menon // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – Vol. 1830, N 5. – P. 3267–3288.

87. Bogovic, P. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management / P. Bogovic, F. Strle // World J. Clin. Cases. – 2015. – Vol. 3, N 5. – P. 430–441.

88. Bolognesi, C. Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells / C. Bolognesi, M. Fenech // Methods Mol. Biol. – 2013. – Vol. 1044. – P. 191–207.

89. Bone, R. C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS / R. C. Bone // Crit. Care Med. – 1996. – Vol. 24, N 7. – P. 1125–1128.

90. Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8+ T-cells [Electronic resource] / D. Růžek, J. Salát, S. K. Singh, J. Kopecký // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N 5. – URL: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020472.

91. Caldecott, K. W. Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin / K. W. Caldecott // DNA Repair. – 2007. – Vol. 6, N 4. – P. 443–453.

92. Cerebral ischemic damage in diabetes: an inflammatory perspective [Electronic resource] / V. Shukla, A. K. Shakya, M. A. Perez-Pinzon, K. R. Dave // J. Neuroinflammation. – 2017. – Vol. 14, N 1. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5260103.

93. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection / W. G. Glass, J. K. Lim, R. Cholera et al. // J. Exp. Med. – 2005. – Vol. 202, N 8. – P. 1087–1098.

94. Ciccia, A. The DNA damage response: making it safe to play with knives / A. Ciccia, S. J. Elledge // Mol. Cell. – 2010. – Vol. 40, N 2. – P. 179–204.

95. Circulating cytokine levels in acute pancreatitis-model of SIRS/CARS can help in the clinical assessment of disease severity / I. Gunjaca, J. Zunic, M. Gunjaca, Z. Kovac // Inflammation. – 2012. – Vol. 35, N 2. – P. 758–763.

96. Clinical and laboratory features that differentiate dengue from other febrile illnesses in an endemic area – Puerto Rico, 2007–2008 / C. J. Gregory, L. M. Santiago, D. F. Arguello et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2010. – Vol. 82, N 5. – P. 922–929.

97. Clinical features of West Nile virus epidemic in Dallas, Texas, 2012 / L. Racsa, R. Gander, W. Chung et al. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 78, N 2. – P. 132–136.

98. Clinical profile and outcome of hospitalized patients during first outbreak of dengue in Makkah, Saudi Arabia / N. A. Khan, E. I. Azhar, S. El-Fiky et al. // Acta Trop. – 2008. – Vol. 105, N 1. – P. 39–44.

99. Coronavirus infection induces DNA replication stress partly through interaction of its nonstructural protein 13 with the p125 subunit of DNA polymerase delta / L. H. Xu, M. Huang, S. G. Fang, D. X. Liu // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286, N 45. – P. 39546–39559.

100. *CYP1A1* and *GSTM1* genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis / R. J. Hung, P. Boffetta, J. Brockmöller et al. // Carcinogenesis. – 2003. – Vol. 24, N 5. – P. 875–882.

101. Decision tree algorithms predict the diagnosis and outcome of dengue fever in the early phase of illness [Electronic resource] / L. Tanner, M. Schreiber, J. G. Low et al. // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2008. – Vol. 2, N 3. – URL: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000196.

102. Decordier, I. The in vitro micronucleus test: from past to future / I. Decordier, M. Kirsch-Volders // Mutat. Res. – 2006. – Vol. 607, N 1. – P. 2–4.

103. Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview [Electronic resource] / S. Prasad, R. K. Sajja, P. Naik, L. Cucullo // J. Pharmacovigil. – 2014. – Vol. 2, N 2. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4306190.

104. DNA damage and cytotoxicity in adult subjects with prediabetes / C. S. Pereira, P. Molz, R. P. Palazzo et al. // Mutat. Res. – 2013. – Vol. 753, N 2. – P. 76–81.

105. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells [Electronic resource] / S. Ohnishi, N. Ma, R. Thanan et al. // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2013. – Vol. 2013. – URL: https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/387014.

106. DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome / A. Karaman, H. Aydın, B. Geçkinli et al. // Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ Mutagen. – 2015. – Vol. 782. – P. 30–35.

107. Effect of GSTM1-Polymorphism on Disease Progression and Oxidative Stress in HIV Infection: Modulation by HIV/HCV Co-Infection and Alcohol Consumption [Electronic resource] / M. Parsons, A. Campa, S. Lai et al. // J. AIDS Clin. Res. – 2013. – Vol. 4, N 9. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3887471.

108. Emerit, I. Clastogenic factors as potential biomarkers of increased superoxide production / I. Emerit // Biomark Insights. – 2007. – Vol. 2. – P. 429–438.

109. Epstein-Barr virus induces an oxidative stress during the early stages of infection in B lymphocytes, epithelial, and lymphoblastoid cell lines / S. Lassoued, R. Ben Ameur, W. Ayadi et al. // Mol. Cell. Biochem. – 2008. – Vol. 313, N 1–2. – P. 179–186.

110. Fang, F.C. Antimicrobial actions of reactive oxygen species [Electronic resource] / F. C. Fang // MBio. – 2011. – Vol. 2, N 5. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3171981.

111. Fawcett, T. An introduction to ROC analysis / T. Fawcett // Pattern Recognition Letters. – 2006. – Vol. 27, N 8. – P. 861–874.

112. Fenech, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations / M. Fenech // Mutat. Res. – 1993. – Vol. 285, N 1. – P. 35–44.

113. Ghosal, G. DNA damage tolerance: a double-edged sword guarding the genome / G. Ghosal, J. Chen // Transl. Cancer Res. – 2013. – Vol. 2, N 3. – P. 107–129.

114. Glutathione S-Transferase Gene Polymorphisms: Modulator of Genetic Damage in Gasoline Pump Workers / K. Priya, A. Yadav, N. Kumar et al. // Int. J. Toxicol. – 2015. – Vol. 34, N 6. – P. 500–504.

115. Gwarzo, M.Y. Extracellular superoxide dismutase activity and plasma malondialdehyde in human immunodeficiency virus subjects of kano state as surrogate

markers of CD4 status / M. Y. Gwarzo, S.A. Muhammad // Int. J. Biomed. Sci. – 2010. – Vol. 6, N 4. – P. 294–300.

116. Hepatitis C Virus Driven AXL Expression Suppresses the Hepatic Type I Interferon Response [Electronic resource] / S. A. Read, E. S. Tay, M. Shahidi et al. // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 8. – URL: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0136227.

117. Hepatitis C virus inhibits DNA damage repair through reactive oxygen and nitrogen species and by interfering with the ATM-NBS1/Mre11/Rad50 DNA repair pathway in monocytes and hepatocytes / K. Machida, G. McNamara, K. T. Cheng et al. // J. Immunol. – 2010. – Vol. 185, N 11. – P. 6985–6998.

118. HIV-1 mediated immune pathogenesis: spotlight on the role of viral protein R (Vpr) / B. Majumder, N. J. Venkatachari, A. Srinivasan, V. Ayyavoo // Curr. HIV Res. – 2009. – Vol. 7, N 2. – P. 169–177.

119. Host genetic variations in glutathione-S-transferases, superoxide dismutases and catalase genes influence susceptibility to malaria infection in an Indian population / R. C. Fernandes, M. Hasan, H. Gupta et al. // Mol. Genet. Genomics. – 2015. – Vol. 290, N 3. – P. 1155–1168.

120. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues / M. Ceppi, B. Biasotti, M. Fenech, S. Bonassi // Mutat. Res. – 2010. – Vol. 705, N 1. – P. 11–19.

121. Impaired virus clearance, compromised immune response and increased mortality in type 2 diabetic mice infected with West Nile virus / M. Kumar, K. Roe, P. V. Nerurkar et al. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, N 8. – URL: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0044682.

122. Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of bladder cancer / B. Pardini, C. Viberti, A. Naccarati et al. // Br. J. Cancer. – 2017. – Vol. 116, N 2. – P. 202–210.

123. Induction of DNA damage signaling upon Rift Valley fever virus infection results in cell cycle arrest and increased viral replication / A. Baer, D. Austin, A. Narayanan et al. // J. Biol. Chem. – 2012. – Vol. 287, N 10. – P. 7399–7410.

124. Induction of *GADD34* Is Necessary for dsRNA-Dependent Interferon-β Production and Participates in the Control of Chikungunya Virus Infection [Electronic resource] / G. Clavarino, N. Cláudio, T. Couderc et al. // PLoS Pathog. – 2012. – Vol. 8, N 5. – URL: http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002708.

125. Influence of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *NAT1*, *NAT2*, *EPHX1*, *MTR* and *MTHFR* polymorphism on chromosomal aberration frequencies in human lymphocytes / C. F. Skjelbred, M. Svendsen, V. Haugan et al. // Carcinogenesis. – 2011. – Vol. 32, N 3. – P. 399–405.

126. Influence of Inflammation in the Process of T Lymphocyte Differentiation: Proliferative, Metabolic, and Oxidative Changes / M.A. Moro-García, J. C. Mayo, R. M. Sainz, R. Alonso-Arias // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 9. – P. 339.

127. Influenza infection induces host DNA damage and dynamic DNA damage responses during tissue regeneration / N. Li, M. Parrish, T. K. Chan et al. // Cell. Mol. Life Sci. – 2015. – Vol. 72, N 15. – P. 2973–2988.

128. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses / J. L. Muñoz-Jordán, M. Laurent-Rolle, J. Ashour et al. // J. Virol. – 2005. – Vol. 79, N 13. – P. 8004–8013.

129. Inhibitory effect of glutathione on oxidative liver injury induced by dengue virus serotype 2 infections in mice [Electronic resource] / J. Wang, Y. Chen, N. Gao et al. // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 1. – URL: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0055407.

130. Jackson, S. P. The DNA-damage response in human biology and disease / S. P. Jackson, J. Bartek // Nature. – 2009. – Vol. 461. – P. 1071–1078.

131. Jeggo, P. A. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? / P. A. Jeggo, M. Löbrich // Oncogene. – 2007. – Vol. 26, N 56. – P. 7717–7719.

132. Ke, P. Y. Hepatitis C virus and cellular stress response: implications to molecular pathogenesis of liver diseases / P. Y. Ke, S.S. Chen // Viruses. – 2012. – Vol. 4, N 10. – P. 2251–2290.

133. Lester, S. N. Toll-like receptors in antiviral innate immunity / S. N. Lester, K. Li // J. Mol. Biol. – 2014. – Vol. 426, N 6. – P. 1246–1264.

134. Levels of malondialdehyde, myeloperoxidase and nitrotyrosine in patients with chronic viral hepatitis B and C / E. S. Namiduru, M. Namiduru, M. Tarakçioğlu, M. Tanriverdi // Adv. Clin. Exp. Med. – 2012. – Vol. 21, N 1. – P. 47–53.

135. Ligor, M. Application of medical and analytical methods in Lyme borreliosis monitoring / M. Ligor, P. Olszowy, B. Buszewski // Anal. Bioanal. Chem. – 2012. – Vol. 402, N 7. – P. 2233–2248.

136. Lipid peroxidation products as potential bioindicators of Lyme arthritis / W. Łuczaj, A. Moniuszko, M. Rusak et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 30, N 3. – P. 415–422.

137. Long-term outcome of acute encephalitis of unknown aetiology in adults / A. Schmidt, R. Bühler, K. Mühlemann et al. // Clin. Microbiol. Infect. – 2011. – Vol. 17, N 4. – P. 621–626.

138. Medical risk factors for severe West Nile Virus disease, United States, 2008–2010 / N. P. Lindsey, J. E. Staples, J. A. Lehman, M. Fischer // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2012. – Vol. 87, N 1. – P. 179–184.

139. Meningoencephaloradiculomyelitis after tick-borne encephalitis virus infection: a case series / M. Ponfick, S. Hacker, H. J. Gdynia et al. // Eur. J. Neurol. – 2012. – Vol. 19, N 5. – P. 776–782.

140. Micronuclei as biomarkers for evaluating the risk of malignant transformation in the uterine cervix / G. M. Aires, J. R. Meireles, P. C. Oliveira et al. // Genet. Mol. Res. – 2011. – Vol. 10, N 3. – P. 1558–1564.

141. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries / S. Y. Kovalev, D. N. Chernykh, V. S. Kokorev et al. // J. Gen. Virol. – 2009. – Vol. 90, Pt. 12. – P. 2884–2289.

142. Outbreak of West Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012 [Electronic resource] / N. Popović, B. Milošević, A. Urošević et al. //

Euro Surveill. – 2013. – Vol. 18, N 43. – URL: http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2013.18.43.20613.

143. Oxidative DNA damage caused by inflammation may link to stress-induced non-targeted effects / C. N. Sprung, A. Ivashkevich, H. B. Forrester et al. // Cancer Lett. – 2015. – Vol. 356, N 1. – P. 72–81.

144. PAH-DNA adducts, cigarette smoking, *GST* polymorphisms, and breast cancer risk / K. M. McCarty, R. M. Santella, S. E. Steck et al. // Environ Health Perspect. – 2009. – Vol. 117, N 4. – P. 552–558.

145. Pak Analysis of oxidative stress status through MN test and serum MDA levels in PCOS women / M. L. Deepika, S. Nalini, G. Maruthi et al. // J. Biol. Sci. – 2014. – Vol. 17, N 4. – P. 574–577.

146. Polymorphisms in chemokine receptor 5 and Toll-like receptor 3 genes are risk factors for clinical tick-borne encephalitis in the Lithuanian population [Electronic resource] / A. Mickienė, J. Pakalnienė, J. Nordgren et al. // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, N 9. – URL: http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106798.

147. Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells [Electronic resource] / O. Torres-Bugarín, M. G. Zavala-Cerna, A. Nava et al. // Dis. Markers. – 2014. – Vol. 2014. – URL: https://dx.doi.org/10.1155/2014/956835.

148. Potts, J.A. Clinical and laboratory features that distinguish dengue from other febrile illnesses in endemic populations / J. A. Potts, A. L. Rothman // Trop. Med. Int. Health. – 2008. – Vol. 13, N 11. – P. 1328–1340.

149. Predicting sequelae and death after bacterial meningitis in childhood: a systematic review of prognostic studies [Electronic resource] / R. C. de Jonge, A. M. van Furth, M. Wassenaar et al. // BMC Infect. Dis. – 2010. – Vol. 10. – URL: https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/ articles/10.1186/1471-2334-10-232.

150. Predisposing Factors Responsible for the Occurrence of Bacterial Purulent Meningoencephalitis / B. Dupanović, O. Gajović, D. Terzić et al. // Acta Clin. Croat. – 2017. – Vol. 56, N 1. – P. 117–123.

151. Quantitative Evaluation of the Severity of Acute Illness in Adult Patients with Tick-Borne Encephalitis [Electronic resource] / P. Bogovic, M. Logar, T. Avsic-Zupanc et al. // Biomed. Res. Int. – 2014. – Vol. 2014. – URL: https://dx.doi.org/10.1155/2014/841027.

152. RANTES, TNF-α, oxidative stress, and hematological abnormalities in hepatitis C virus infection / G. A. Tawadrous, A. A. Aziz, D. G. Amin et al. // Investig. Med. – 2012. – Vol. 60, N 6. – P. 878–882.

153. Reduced immune cell infiltration and increased pro-inflammatory mediators in the brain of Type 2 diabetic mouse model infected with West Nile virus [Electronic resource] / M. Kumar, K. Roe, P. V. Nerurkar et al. // J. Neuroinflammation. – 2014. – Vol. 11. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4001407.

154. Regulation of type I interferon responses by mitochondria-derived reactive oxygen species in plasmacytoid dendritic cells / Z. Agod, T. Fekete, M. M. Budai et al. // Redox. Biol. – 2017. – Vol. 13. – P. 633–645.

155. Reshi, M. L. RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death [Electronic resource] / M. L. Reshi, Y. C. Su, J. R. Hong // Int. J. Cell. Biol. – 2014. – Vol. 2014. – URL: https://dx.doi.org/10.1155/2014/467452.

156. Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis [Electronic resource] / M. Murata, R. Thanan, N. Ma, S. Kawanishi // J. Biomed. Biotechnol. – 2012. – Vol. 2012. – URL: https://dx.doi.org/10.1155/2012/623019.

157. Roos, W. P. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis / W. P. Roos, B. Kaina // Cancer Lett. – 2013. – Vol. 332, N 2. – P. 237–248.

158. Ryan, E. L. Activation of the DNA Damage Response by RNA Viruses / E. L. Ryan, R. Hollingworth, R. J. Grand // Viruses Biomolecules. – 2016. – Vol. 6, N 1. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pmc/articles/PMC4808796.

159. Salcuni, P. West Nile disease: review of clinical features and risk factors associated with severe disease / P. Salcuni, C. Rizzo // Infez. Med. – 2011. – Vol. 19, N 1. – P. 5–15.

160. Sensitivity and specificity of a novel classifier for the early diagnosis of dengue [Electronic resource] / N. M. Tuan, H. T. Nhan, N. V. Chau et al. // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2015. – Vol. 9, N 4. – URL: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003638.

161. Shuai, K. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system / K. Shuai, B. Liu // Nat. Rev. Immunol. – 2003. – Vol. 3, N 11. – P. 900–911.

162. Siddiqi, N. Credit risk scorecards: developing and implementing intelligent credit scoring / N. Siddiqi. – New York : John Wiley & Sons, 2006. – 254 p.

163. Sies, H. Oxidative Stress / H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones // Annu Rev. Biochem. – 2017. – Vol. 86. – P. 715–748.

164. Siomek, A. NF-κB signaling pathway and free radical impact / A. Siomek // Acta Biochim. Pol. – 2012. – Vol. 59, N 3. – P. 323–331.

165. Skogman, B. H. The NeBoP score – a clinical prediction test for evaluation of children with Lyme Neuroborreliosis in Europe / B. H. Skogman, J. Sjöwall, P. E. Lindgren //BMC Pediatr. – 2015. – Vol. 15. – P. 214.

166. Statistical methods in biology: design and analysis of experiments and regression / S. J. Welham, S. Gezan, S. Clark, A. Mead. – New York : CRC Press Taylor & Francis Group, 2015. – 563 p.

167. Structural chromosome abnormalities, increased DNA strand breaks and DNA strand break repair deficiency in dermal fibroblasts from old female human donors / F. Kalfalah, S. Seggewiß, R. Walter et al. // Aging (Albany NY). – 2015. – Vol. 7, N 2. – P. 110–122.

168. Study of Japanese encephalitis and other viral encephalitis in Nepali children / A. Rayamajhi, R. Singh, R. Prasad et al. // Pediatr. Int. – 2007. – Vol. 49, N 6. – P. 978–984.

169. Suss, J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007 [Electronic resource] / J. Suss // Eurosurveillance. – 2008. – Vol. 13, N 26. – URL: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18916.

170. The expression of the chemokine receptor CCR5 in tick-borne encephalitis [Electronic resource] / S. Grygorczuk, J. Osada, M. Parczewski et al. // J. Neuroinflammation. – 2016. – Vol. 13. – URL: https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-016-0511-0.

171. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future / M. Fenech, N. Holland, E. Zeiger et al. // Mutagenesis. – 2011. – Vol. 26, N 1. – P. 239–245.

172. The increased concentration of macrophage migration inhibitory factor in serum and cerebrospinal fluid of patients with tick-borne encephalitis [Electronic resource] / S. Grygorczuk, M. Parczewski, R. Świerzbińska et al. // J. Neuroinflammation. – 2017. – Vol. 14, N 1. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5483307.

173. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps / N. Holland, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders et al. // Mutat. Res. – 2008. – Vol. 659, N 1–2. – P. 93–108.

174. Thomas, P. Buccal micronucleus cytome assay / P. Thomas, M. Fenech // Methods Mol. Biol. – 2011. – Vol. 682. – P. 235–248.

175. Tick-borne encephalitis virus: epidemiological and clinical picture, diagnosis and prevention / T. Vilibić-Čavlek, L. Barbić, N. Pandak et al. // Acta Med. Croatica. – 2014. – Vol. 68, N 4. – P. 5393–5404.

176. Tick-borne encephalitis--lipid peroxidation and its consequences / W. Łuczaj, A. Moniuszko, I. Jarocka-Karpowicz et al. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 2016. – Vol. 76, N 1. – P. 1–9

177. TLR signaling controls lethal encephalitis in WNV-infected brain / A. H. Sabouri, M. C. Marcondes, C. Flynn et al. // Brain Res. – 2014. – Vol. 1574. – P. 84–95.

178. Toledano, M. B. The Unfinished Puzzle of Glutathione Physiological Functions, an Old Molecule That Still Retains Many Enigmas / M. B. Toledano, M. E. Huang // Antioxid. Redox. Signal. – 2017. – Vol. 27, N 15. – P. 1127–1129.

179. Turnell, A. S. DNA viruses and the cellular DNA-damage response / A. S. Turnell, R. J. Grand // J. Gen. Virol. – 2012. – Vol. 93. – P. 2076–2097.

180. Variability in the 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene cluster is associated with human predisposition to tick-borne encephalitis virus-induced disease / A. V. Barkhash, A. A. Perelygin, V. N. Babenko et al. // J. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 202, N 12. – P. 1813–1818.

181. Wang, L. Structural Basis for Avoidance of Promutagenic DNA Repair by MutY Adenine DNA Glycosylase / L. Wang, S. J. Lee, G. L. Verdine // J. Biol. Chem. – 2015. – Vol. 290, N 28. – P. 17096–17105.

182. Weitzman, M. D. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity / M. D. Weitzman, J. B. Weitzman // Cell. Host. Microbe. – 2014. – Vol. 15, N 3. – P. 283–294.

183. Working Group For Tick-Borne Encephalitis Virus C. Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009 [Electronic resource] / O. Donoso Mantke, C. Escadafal, M. Niedrig, M. Pfeffer // Euro Surveill. – 2011. – Vol. 16, N 39. – URL: https://www.eurosurveillance.org/ content/10.2807/ese.16.39.19976-en.