

На правах рукописи

БАБАЕВА

Лариса Владимировна

**ИММУННЫЙ СТАТУС И КАРИОПАТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ
ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ИКСОДОВОМ КЛЕЩЕВОМ
БОРРЕЛИОЗЕ И ИНФЕКЦИИ-МИКСТ**

14.00.16 – патологическая физиология

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

ТОМСК-2003

Работа выполнена в Сибирском государственном медицинском университете МЗ РФ

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАМН,
Заслуженный деятель науки РФ

Новицкий Вячеслав Викторович

кандидат медицинских наук

Пирогова Наталия Петросовна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Степовая Елена Алексеевна

кандидат медицинских наук

Васильев Николай Вольтович

Ведущая организация:

Новосибирская государственная медицинская академия МЗ РФ

Защита состоится “ ____ ” _____ 2003 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, Томск, Московский тр., 2).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, Томск, пр. Ленина, 107).

Автореферат разослан “ ____ ” _____ 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Бражникова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Иксодовый клещевой боррелиоз (болезнь Лайма, Лайм-боррелиоз) – инфекционное трансмиссивное природно-очаговое заболевание, имеющее тенденцию к хроническому и рецидивирующему течению, поражающее многие органы и системы (кожу, нервную систему, опорно-двигательный аппарат, сердце и др.) [Aberer E., 1995; Ющук Н.Л., 1996; Балашов Ю.С., 1998; Тарасов В.А., 1998; Лобзин Ю.В., Усков А.Н., 1999; Ананьева Л.П., 2000; Кондратьев В.Г. и соавт., 2001]. Возбудитель болезни Лайма – грамотрицательная спирохета, относящаяся к виду *Borrelia burgdorferi*, передается иксодовыми клещами [Andersson U., 1990; Рахманова А.Т. и соавт., 1995; Bockenstedt L.K., 1997; Антонова Т.В. и соавт., 2000].

Природные очаги иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) имеют широкое распространение в Северной Америке, Европе и Азии [Ананьева Л.П. и соавт., 1990; White D.J. et al., 1991; Wooten R.M., 2002]. Благодаря относительно высокому уровню заболеваемости (по сравнению с другими природно-очаговыми трансмиссивными инфекциями) и нередко тяжелому течению иксодовый клещевой боррелиоз представляет собой одну из актуальных проблем современной инфекционной патологии и паразитологии в России [Коренберг Э.И., 1996; Лобзин Ю.В. и соавт., 1997].

Кроме того, на различных территориях России все чаще регистрируются случаи сочетанного инфицирования боррелиями и вирусом клещевого энцефалита [Алексеев А.Н., 1996, 2001; Simperman J., 1998; Якушева С.С. и соавт., 2002]. Широкое распространение природно-очаговых микст-инфекций, передающихся клещами, обусловлено закономерностями взаимоотношений различных возбудителей в организме переносчика и в экосистеме [Thompson Ch., 2001; Коренберг Э.И., 2002].

Известно, что элиминация патогенов с внутриклеточной локализацией, к которым относится вирус клещевого энцефалита, осуществляется за счет активации клеточного звена иммунной системы [Покровский В.И. и соавт., 1994; Лобзин Ю.В., Усков А.Н., 1999]. Для антибактериального иммунитета, в частности противоборрелиозного (боррелии являются возбудителями с преимущественной внеклеточной локализацией), особое значение имеют уровень циркулирующих антител, функциональное состояние системы комплемента и лейкоцитов с

цитотоксическими эффектами [Hyde R.M., 1994; Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2000].

В последние годы исследовательский интерес направлен на изучение эпидемиологии, геновидов возбудителей иксодового клещевого боррелиоза и клещевого энцефалита, клинической картины и диагностики природно-очаговых заболеваний. Вместе с тем, сведения, раскрывающие механизмы развития иммунопатологических реакций в организме при одновременном внедрении нескольких патогенов, весьма отрывочны и носят сугубо описательный характер [Коренберг Э.И., 1996; Postic D. et al., 1997; Кондратьев В.Г., 2000]. Установлено, что в формировании хронического течения инфекции важная роль принадлежит возможности длительного (многолетнего) внутриклеточного персистирования боррелий, например в клетках системы мононуклеарных фагоцитов, являющихся основными антигенпрезентирующими элементами и опосредующими стимуляцию специфического иммунного ответа [Hyde R.M., 1994; Ющук Н.Л., 1996; Лобзин Ю.В., Усков А.Н., 1999]. Структурно-функциональная дезорганизация иммунокомпетентных клеток усугубляется явлением тропизма возбудителей (флавивirusы обладают лимфотропностью) [Ратникова Л.И. и соавт., 2002]. Нестабильность хромосомного аппарата иммуноцитов, индуцированная инфекционными агентами, часто не сопровождается цитопатическими явлениями и во многом детерминирует развитие иммунодефицитного состояния организма.

В связи с этим изучение иммунологических и кариопатических изменений при клещевых нейроинфекциях представляет большой исследовательский интерес и значимый практический потенциал для клинической иммунологии и инфекционной патологии.

Цель исследования. Установить особенности и выявить общие закономерности изменений иммунного статуса и хромосомного аппарата лимфоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом и инфекцией-микст (иксодовый клещевой боррелиоз, ассоциированный с клещевым энцефалитом).

Задачи исследования:

1. Установить общие закономерности нарушений функционального состояния и генетического аппарата лимфоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом и при его сочетании с клещевым энцефалитом на фоне проводимой терапии.

2. Дать характеристику иммунного статуса и кариопатических изменений лимфоцитов у больных клещевыми нейроинфекциями в динамике острого процесса, а также в отдаленный период.
3. Вскрыть механизмы нарушений взаимодействий иммунокомпетентных клеток в зависимости от их способности секретировать гуморальные регуляторные пептиды у больных иксодовым клещевым боррелиозом и инфекцией-микст.

Положения, выносимые на защиту:

1. В основе механизмов нарушения кооперации иммуноцитов при клещевых нейроинфекциях лежат гиперпродукция ИФН- γ и ИЛ-10 (при остром течении иксодового клещевого боррелиоза), гипосекреция ИЛ-10, ИЛ-4 (при хронической форме клещевого боррелиоза) и ИЛ-12 (при ассоциированной инфекции).
2. Факторами, предрасполагающими к развитию хронической формы боррелиозного процесса, являются увеличение количества цитотоксических лимфоцитов, натуральных киллеров и В-лимфоцитов, а также хромосомная нестабильность иммунокомпетентных клеток при угнетении внепланового синтеза ДНК.
3. Вирусно-боррелиозная инфекция характеризуется более выраженными иммунологическими и цитогенетическими изменениями в лимфоцитах периферической крови, чем бактериальная моноинфекция. Изменения содержания ферментов и субстратов в лимфоцитах периферической крови носят однонаправленный характер как при моно-, так и при микст-инфекции.

Научная новизна. С использованием современных методов изучения функционального статуса лимфоцитов периферической крови впервые дана комплексная оценка иммунологического статуса и хромосомного аппарата лимфоцитов у больных иксодовым клещевым боррелиозом и с инфекцией-микст в динамике развития заболевания. Установлено, что при иксодовом клещевом боррелиозе и инфекции-микст регистрируется Т-иммунодефицит (CD3+-лимфоциты) на протяжении всего инфекционного процесса и в отдаленный период после заболевания (через 6 месяцев). Содержание CD8+-клеток увеличивается к окончанию острой фазы заболевания у больных с эритемной серонегативной формой клещевого боррелиоза и уменьшается у пациентов, страдающих хронической бактериальной инфекцией, а также у выздоровевших лиц. Количество В-клеток снижается в начале патологического процесса (при эритемной серопозитивной форме боррелиоза и инфекции-микст) и повышается к исходу заболевания смешанной этиологии (4-ая неделя). Нарушения межклеточных

взаимодействий при остром течении иксодового клещевого боррелиоза обусловлены повышенной секрецией ИФН- γ и ИЛ-10; при персистирующей бактериальной инфекции - уменьшением продукции ИЛ-10 и ИЛ-4. Присоединение вирусной инфекции на фоне хронического течения иксодового клещевого боррелиоза приводит к снижению секреции ИЛ-12. Изменения цитохимического статуса (снижение активности ферментов и содержания субстратов), пролиферативной активности (стимуляция), хромосомного аппарата (увеличение числа аберрантных лимфоцитов) и системы ДНК-репарации (угнетение) в иммунокомпетентных клетках носят однонаправленный характер как у моно-, так и у микст-инфицированных пациентов.

Область применения. Полученные знания фундаментального характера, касающиеся иммунного статуса и цитогенетических особенностей лимфоцитов периферической крови при иксодовом клещевом боррелиозе и инфекции-микст (хронический клещевой боррелиоз, ассоциированный с лихорадочной формой клещевого энцефалита), могут представлять интерес для специалистов в области клинической иммунологии, микробиологии, патофизиологии, инфекционных болезней, а также служить патогенетической основой для разработки новых способов коррекции гематологических изменений при клещевых нейроинфекциях. Приоритетными и принципиально новыми можно считать полученные данные об участии гуморальных регуляторных пептидов в механизмах нарушения межклеточной кооперации иммунокомпетентных клеток.

Реализация и апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на региональной научной конференции “Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии”, посвященной 150-летию чл.-корр. РАН А.С. Догеля (Томск, 2002); на 1-ой Всероссийской научной конференции с участием зарубежных специалистов “Актуальные проблемы эволюционной и популяционной физиологии человека” (Тюмень, 2001); на конференции, посвященной 75-летию профессора А.С. Зиновьева (Омск, 2001); на межгородской конференции молодых ученых “Актуальные проблемы патофизиологии” (Санкт-Петербург, 2002); на втором и третьем конгрессах молодых ученых и специалистов “Науки о человеке” (Томск, 2001, 2002) и на научных семинарах кафедры патологической физиологии СибГМУ (Томск, 2001-2003).

Результаты проведенного исследования включены в учебный процесс в Сибирском государственном медицинском университете и используются в

лекционных курсах на кафедрах патофизиологии (Разделы “Реактивность и резистентность”, “Патология иммунитета и аллергии”), микробиологии (Разделы “Патогенные спирохеты”, “Вирусы комплекса клещевого энцефалита”), инфекционных болезней (Раздел “Нейроинфекции”).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 2 в центральных реферируемых журналах.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 186 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, включающего 345 источников, из которых 225 отечественных и 120 иностранных. Диссертация иллюстрирована 9 таблицами и 11 рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе обобщены и проанализированы результаты изучения иммунного статуса и кариопатических изменений лимфоцитов периферической крови у 109 пациентов, страдающих иксодовым клещевым боррелиозом и инфекцией-микст (иксодовый клещевой боррелиоз, ассоциированный с клещевым энцефалитом). Пациенты находились на стационарном лечении в инфекционной клинике СибГМУ (зав. кафедрой – д.м.н., профессор А.В. Лепехин, зав. клиникой – к.м.н., доцент Н.С. Бужак), инфекционном отделении 3-ей городской больницы (главный врач - к.м.н. А.А. Орешин, зав. отделением – Г.В. Западаева) и медико-санитарной части «Строитель» (главный врач – В.Г. Козлов, зав. отделением – О.В. Буров).

Подавляющее большинство заболевших - это люди зрелого возраста (80,3%), больные в возрасте от 18 до 30 лет составляли 13,5% среди всех обследованных лиц, 61-65 лет – 6,2%. Удельная доля мужчин и женщин в возрастной группе до 30 лет была практически равной (7,3% и 8,0% соответственно), в группах старше 30 среди всех больных пациентов преобладали мужчины (50,0%).

Больные иксодовым клещевым боррелиозом распределялись по группам согласно клинической классификации, предложенной Ю.В. Лобзиным и соавт. [2000], и медико-экономическим стандартам [2002]: пациенты, страдающие манифестной эритемной формой ИКБ, с острым течением, серопозитивный вариант, легкой и средней степеней тяжести (n=18); пациенты, страдающие манифестной эритемной формой ИКБ, с острым течением, серонегативный вариант, легкой и средней степеней тяжести (n=16); пациенты, страдающие

манифестной безэритемной формой ИКБ, с острым течением, серопозитивный вариант, легкой и средней степеней тяжести (n=42); пациенты, страдающие ИКБ, с хроническим рецидивирующим течением, с преимущественным поражением нервной системы и опорно-двигательного аппарата, в стадии компенсации (n=21). У больных с инфекцией-микст регистрировалось лабораторное подтверждение наличия в крови антител, антигена, РНК и/или ДНК возбудителей обеих нейроинфекций – пациенты с хроническим рецидивирующим течением ИКБ (с преимущественным поражением нервной системы и опорно-двигательного аппарата, стадия компенсации), ассоциированным с лихорадочной формой клещевого энцефалита (легкая и средняя степени тяжести) (n=12).

Диагноз заболевания устанавливался на основе клинической картины заболевания, данных анамнеза и идентификации возбудителей при помощи серологических и молекулярно-генетических методов.

Контрольную группу составляли 47 практически здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Лица данной группы не страдали аллергическими заболеваниями и не имели эпизодов присасывания клещей. На протяжении последних лет ОРЗ и ОРВИ регистрировались не чаще 3-4 раз в год у 47 (100%) пациентов контрольной группы и не позже, чем за 6 недель до проведения исследования.

Исследовались параметры структурно-функционального статуса лимфоцитов периферической крови с использованием иммунологических, генетических, культуральных и цитохимических методов исследования.

Субпопуляционный состав лимфоцитарных клеток периферической крови определяли в лимфоцитотоксическом тесте с помощью моноклональных антител [Петров Р.В. и соавт., 1992].

Культуральную суспензию для оценки уровня продукции цитокинов, пролиферативной активности лимфоцитов и хромосомных aberrаций в лимфоцитарных клетках готовили по методам, описанным Е.У. Пастером и соавт. [1989] и Е.Д. Гольдбергом и соавт. [1992]. Для определения уровней ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-10 и ИЛ-12 в супернатантах использовали твердофазный иммуноферментный “сэндвичевый” метод (“Cytimmune”, США).

Индуцированную митогенами бласттрансформацию лимфоцитов периферической крови оценивали, добавляя в клеточную суспензию фитогемагглютинин (ФГА) (“Becton Dickinson”, Германия) и липополисахарид (ЛПС) (LPS from E. coli 026:B6 фирмы “Sigma”, США). Результаты выражали

количеством бластных форм лимфоцитов (%).

Приготовление препаратов для хромосомного анализа лимфоцитов периферической крови проводили по методу P.S. Moorhead et al. [1960]. У каждого обследуемого анализировали 100 метафазных пластинок. Учитывали число клеток с хромосомными нарушениями, количество и типы нарушений хромосом.

Исследование активности эксцизионной ДНК-репарации лимфоцитарных клеток проводили методом сцинтилляционной радиометрии с использованием УФ-облучения [Засухина Г.Д., 1975]. Для выражения результатов рассчитывали индекс стимуляции (ИС) репарационной системы ДНК.

Цитохимическое исследование активности кислой фосфатазы и содержание гликогена в лимфоцитах проводили стандартными методами, вычисляя средний цитохимический коэффициент. Ферментативную активность кислой фосфатазы определяли по методу A. Goldberg, T. Varca, содержание гликогена оценивали по методу McManus (ШИК-реакция) [Хейхоу Дж. Ф. Г., Кваглино Д., 1983].

Оценку полученных данных проводили с использованием методов статистического анализа и проверки гипотез [Лакин Г.Ф., 1980]. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Сравнение средних величин изучаемых показателей проводили по критерию Стьюдента (t-критерий). В случае отклонения распределения от нормального использовали непараметрические критерии Манна-Уитни и Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основная роль в формировании противоборрелиозного иммунитета принадлежит клеточным механизмам [Aberer E., 1995; Ющук Н.Л., 1996; Козлов С.С., 1999; Макаренко Л.А. и соавт., 2002]. Состояние клеточного звена специфического иммунного ответа во многом определяет исход первичного инфицирования, частоту и напряженность рецидивов заболевания [Bockenstedt L.K., 1997; Железникова Г.Ф. и соавт., 2002]. Известно, что лимфоциты обладают уникальными свойствами: высокой изменчивостью, деформируемостью, инвазивностью и способностью к рециркуляции, обеспечивающими возможность иммунологического надзора, распознавание и координацию работы лимфоидных органов [Козинец Г.И., 1970; Pero R.W. et al., 1981; Paul W.E., 1999]. В то же время лимфоидные элементы, будучи мигрирующими клетками, способны отражать

изменения, происходящие в организме при внедрении инфекционного агента [Робинсон М.В. и соавт., 1986; Петров Р.В., 1987; Титова Н.Г., 1996; Игнатъева Г.А., 1997].

Полученные нами данные указывают на то, что у больных с манифестной эритемной формой ИКБ (серопозитивный вариант) на 2-ой неделе заболевания отмечалось снижение числа клеток, экспрессирующих CD3-антигены (рис. 1). Это явление можно объяснить, на наш взгляд, двумя причинами: ингибцией возбудителем функций системы клеточного иммунитета или перераспределением Т-лимфоцитов в периферической крови к основному очагу инфекции - коже [Цыбульская Н.В., Осидан Л.В., 1980]. Известно, что после инокуляции боррелии в месте ее внедрения в коже развивается неспецифическое кожное воспаление, клинически проявляющееся хронической мигрирующей эритемой Афцелиуса-Липшютца [Макаренко Л.А. и соавт., 2002].

В течение нескольких недель после проявления первичной мигрирующей эритемы у части пациентов развиваются вторичные кольцевидные поражения кожи на отдельных участках тела, связанные с диссеминацией возбудителя (вторичная эритема). По данным Ю.В. Лобзина [2000], боррелии используют фармакологические свойства слюны переносчика, влияющие на способность макрофагов к синтезу оксида азота и тем самым способствующие трансмиссии патогена в организме. Известно цитопатическое действие боррелий, в частности, на лимфоциты, которое проявляется в процессе размножения микроорганизмов и является пусковым фактором для подавления защитных механизмов хозяина.

Длительная локализация возбудителя в коже приводит к запаздыванию иммунного ответа (позднее появление специфических антител, совпадающее с фазой диссеминации боррелии) [Гавришева Н.А., Антонова Т.В., 1999]. Данный факт объясняет зарегистрированное нами уменьшение количества CD72⁺-В-лимфоцитов (предшественники клеток - продуцентов антител) у больных ИКБ на 2-ой неделе инфекционного процесса, однако на 4-ой неделе заболевания данный показатель достигал контрольных значений (рис. 1). Как свидетельствуют данные литературы, при наличии мигрирующей эритемы у больных Лайм-боррелиозом гуморальный ответ в начале острого периода слабо выражен, нарастание антиборрелиозных антител происходит к окончанию инфекционного процесса [Деконенко Е.П. и соавт., 1995].

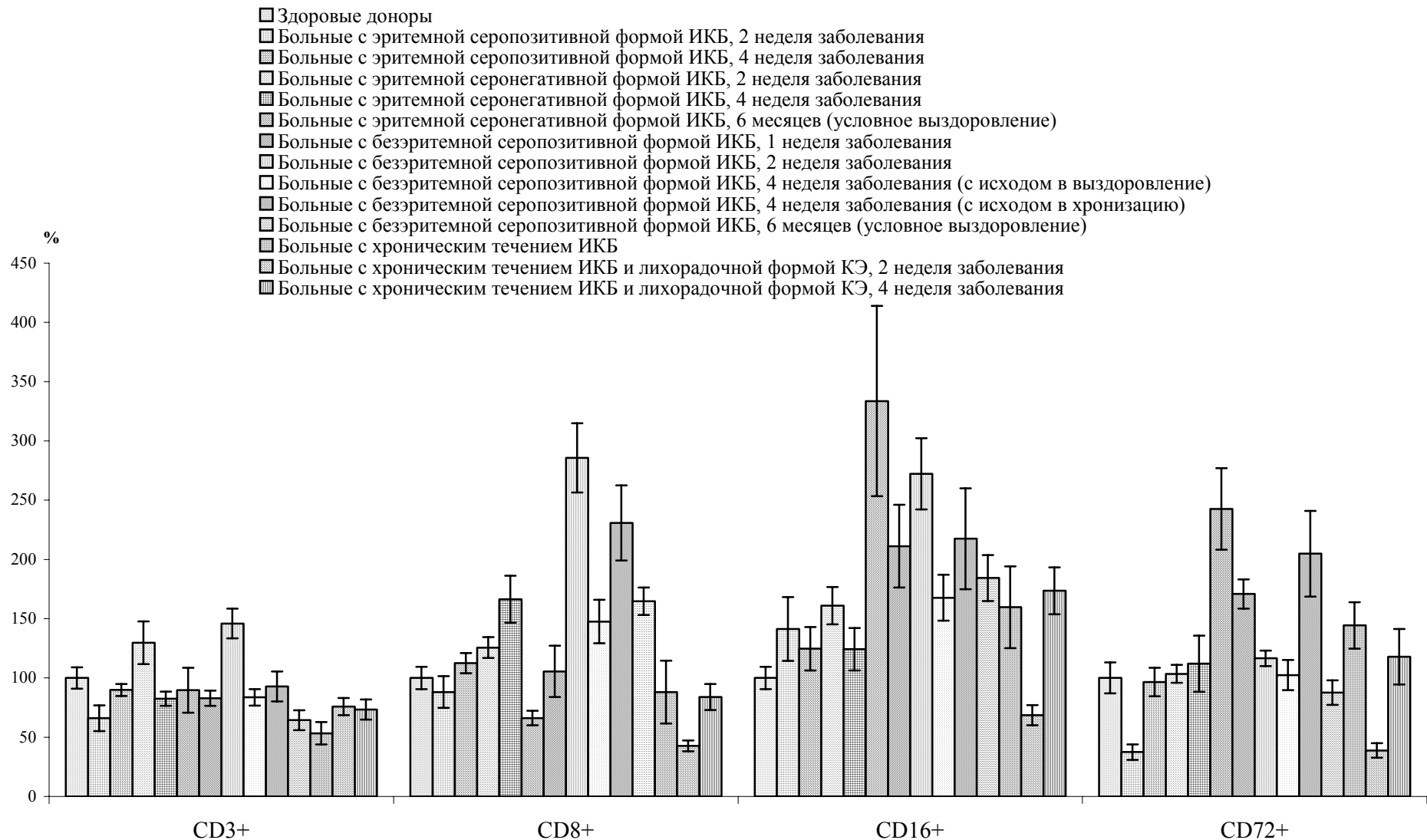


Рис. 1. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у больных исходовым клещевым боррелиозом и инфекцией-микст (по оси ординат - % от контрольных значений)

Использование цитохимических реакций для изучения метаболического статуса клеток позволяет выявить структурно-химические изменения в клетке и степень нарушения обменных процессов в ней на различных стадиях патологического процесса [Алмазов В. А. и соавт., 1979; Хейхоу Дж. Ф. Г., Кваглино Д., 1983]. Проведенное нами цитохимическое исследование лимфоцитов периферической крови показало уменьшение содержания гликогена в лимфоцитарных клетках (по сравнению с контролем) у больных с острым и хроническим течением ИКБ (рис. 2). Известно, что гликоген формирует энергетический резерв организма [Хейхоу Дж. Ф. Г., Кваглино Д., 1983; Меньшиков В.В., 1987]. Основными причинами падения уровня гликогена в клетках крови являются дефицит глюкозы в организме, активное расходование метаболита в реакциях внутриклеточного обмена, в процессе фагоцитоза и переваривания генетически чужеродных агентов, в том числе бактерий.

Кроме того, у пациентов, страдающих эритемной формой ИКБ (серопозитивный вариант) на 2-ой неделе заболевания было отмечено понижение среднего цитохимического коэффициента (СЦК) кислой фосфатазы, однако к 4-ой неделе активность данного фермента достоверно превышала показатели в контрольной группе (рис. 2).

Известно, что кислая фосфатаза является маркерным ферментом лизосом, которые играют весьма важную роль в процессах фагоцитоза и внутриклеточного переваривания. Наблюдавшееся нами на 4-ой неделе заболевания у больных с эритемной формой ИКБ увеличение активности лизосомального фермента повышало протективный потенциал клетки и свидетельствовало о пребывании ее в состоянии высокой функциональной активности (рис. 2) [Покровский А.А., Тутельян В.А., 1976].

Острое и хроническое течение ИКБ сопровождалось явлениями выраженной генетической нестабильности. Так, у пациентов, страдающих ИКБ, регистрировались повышение (по сравнению с нормой) общего количества лимфоцитов с хромосомными aberrациями, в основном за счет клеток с нарушениями структуры хромосом, а также увеличение числа хромосомных нарушений на клетку (рис. 3). В числе структурных aberrаций хромосом в лимфоцитарных клетках у больных ИКБ учитывались хромосомные разрывы и обмены (парные фрагменты, кольцевые и дицентрические хромосомы) и хроматидные разрывы (одиночные фрагменты). При этом у больных ИКБ отмечалось повышение (по сравнению с контролем) содержания клеток с aberrа-

- Здоровые доноры
- Больные с эритемной серопозитивной формой ИКБ, 2 неделя заболевания
- Больные с эритемной серопозитивной формой ИКБ, 4 неделя заболевания
- Больные с эритемной серонегативной формой ИКБ, 2 неделя заболевания
- Больные с эритемной серонегативной формой ИКБ, 4 неделя заболевания
- Больные с эритемной серонегативной формой ИКБ, 6 месяцев (условное выздоровление)
- Больные с безэритемной серопозитивной формой ИКБ, 1 неделя заболевания
- Больные с безэритемной серопозитивной формой ИКБ, 2 неделя заболевания
- Больные с безэритемной серопозитивной формой ИКБ, 4 неделя заболевания (с исходом в выздоровление)
- Больные с безэритемной серопозитивной формой ИКБ, 4 неделя заболевания (с исходом в хронизацию)
- Больные с безэритемной серопозитивной формой ИКБ, 6 месяцев (условное выздоровление)
- Больные с хроническим течением ИКБ
- Больные с хроническим течением ИКБ и лихорадочной формой КЭ, 2 неделя заболевания
- Больные с хроническим течением ИКБ и лихорадочной формой КЭ, 4 неделя заболевания

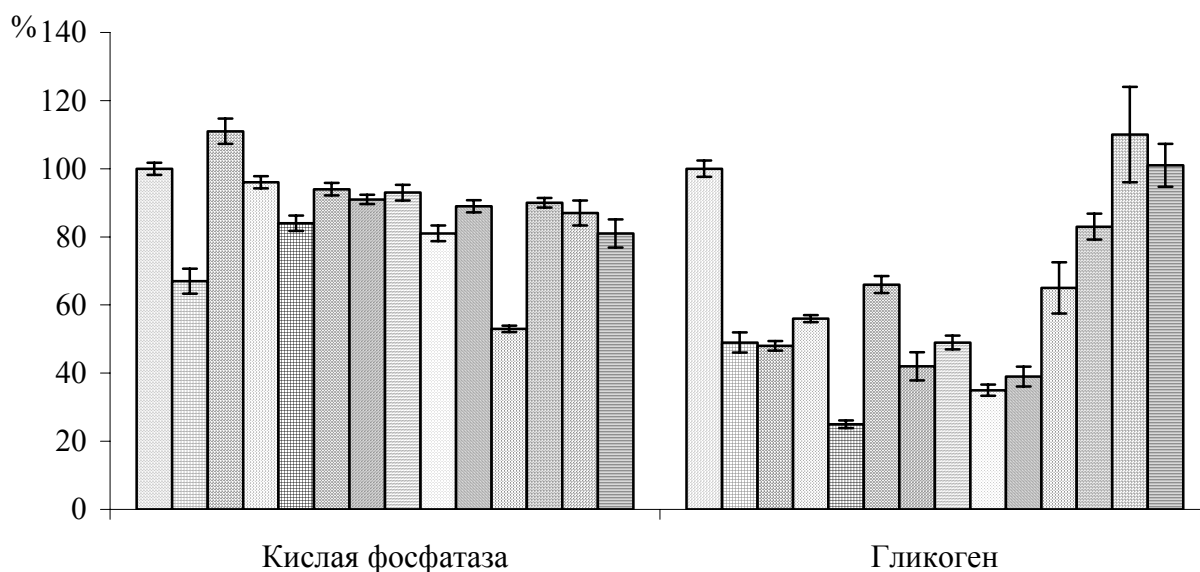


Рис. 2. Содержание кислой фосфатазы и гликогена в лимфоцитах периферической крови у больных исходом клещевым боррелиозом и инфекцией-микст (по оси ординат - % от контрольных значений)



Рис.3. Метафазная пластинка в культуре лимфоцитов периферической крови с парным фрагментом и дицентрической хромосомой больного М., 45 лет (Диагноз: Иксовый клещевой боррелиоз, острое течение). Окраска азурII-эозином, увеличение 900.

циями хроматидного и хромосомного типов, при этом преобладали лимфоциты с одиночными фрагментами хромосом. В отличие от вирусных агентов, которые непосредственно воздействуют на хромосомный аппарат клетки путем проникновения в ядро и репликации вирусной ДНК, мутагенное действие бактерий (в частности боррелий) реализуется опосредованно, под действием эндотоксинов. Генотоксические эффекты бактериальных токсинов обусловлены изменением активности ферментов нуклеинового, белкового и липидного обменов.

Мутагенное действие инфекционных возбудителей на клетки макроорганизма определяется не только характером и степенью выраженности вызываемых ими хромосомных повреждений, но и эффективностью систем, обеспечивающих поддержание цитогенетической нормы как на молекулярном, так и на клеточном уровнях. Имеются данные о том, что накопление генетически измененных клеток в организме может быть обусловлено подавлением ДНК-репаративных клеточных систем [Ауэрбах Ш., 1978; Дубинин Н.П., 1978]. В ходе нашего исследования у больных с острым и хроническим течением ИКБ было выявлено снижение индекса стимуляции репарационной системы ДНК лимфоцитов, вызванное воздействием на культуру УФ-лучей, с чем, видимо, и было связано увеличение количества клеток с кариопатическими изменениями (рис. 4). Вполне возможно, что зарегистрированный нами высокий уровень цитоген-

- Здоровые доноры
- ▣ Больные с эритемной серопозитивной формой ИКБ, 2 неделя заболевания
- ▤ Больные с эритемной серопозитивной формой ИКБ, 4 неделя заболевания
- ▥ Больные с безэритемной серопозитивной формой ИКБ, 1 неделя заболевания
- ▦ Больные с безэритемной серопозитивной формой ИКБ, 2 неделя заболевания
- ▧ Больные с хроническим течением ИКБ
- ▨ Больные с хроническим течением ИКБ и лихорадочной формой КЭ, 2 неделя заболевания
- ▩ Больные с хроническим течением ИКБ и лихорадочной формой КЭ, 4 неделя заболевания

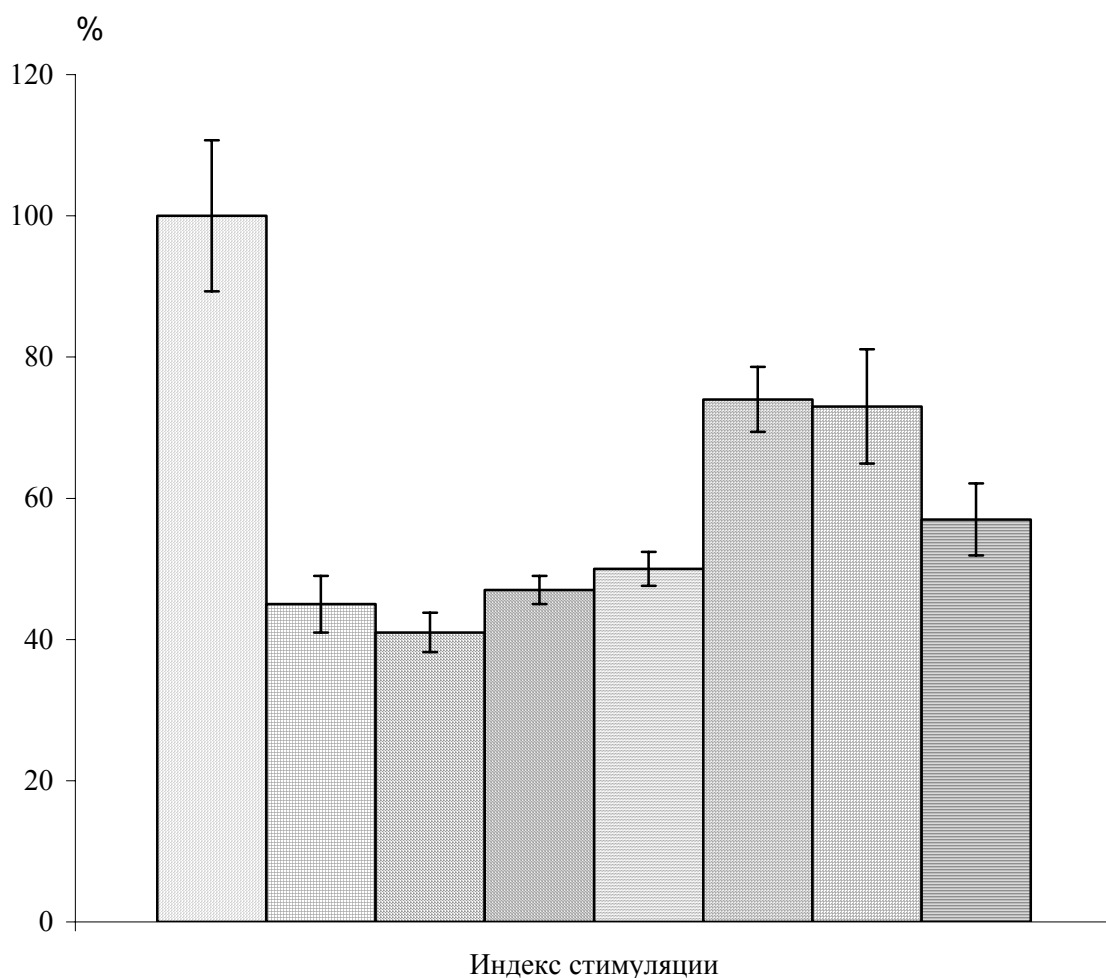


Рис. 4. Активность системы репарации ДНК в лимфоцитах периферической крови (по оси ординат - % от контрольных значений) у больных иксодовым клещевым боррелиозом и инфекцией-микст

нетических нарушений в клетках организма-хозяина, их гибель при действии бактерий также были обусловлены, прежде всего, отклонениями в функционировании клеточных механизмов ДНК-репарации [Дубинин Н.П., Засухина Г.Д., 1975; Кудрявцев Д.М., 1992; Засухина Г.Д., Синельщикова Т.А., 1993]. В свою очередь гибель и элиминация мутантных клеток из организма при инфекционном процессе сопровождаются, как правило, снижением плотности клеточной популяции, изменением кинетики клеток, сокращением продолжительности их митотического цикла, что обуславливает возрастание числа нерепарируемых дефектов в активном хроматине, имеющих высокий канцерогенный потенциал [Hart R.W., Setlow R.B., 1974].

По данным И.А. Скрипниковой и соавт. [1995], у части больных с типичной клинической картиной ИКБ при неоднократном обследовании в крови не обнаруживались антитела к *Borrelia burgdorferi* или титры противоборрелиозных иммуноглобулинов оказывались диагностически недостоверными (менее 1:20). Совпадение условий наличия несомненных клинических симптомов клещевого боррелиоза (в числе которых мигрирующая эритема) и отсутствия специфических антител служило основанием для выделения серонегативной формы ИКБ.

Проведенный нами анализ субпопуляционного состава лимфоцитов у больных с манифестной эритемной формой ИКБ (серонегативный вариант) показал, что на 2-ой неделе заболевания регистрировалось повышение количества CD16⁺-лимфоцитов (натуральные киллеры) (рис. 1). Как известно, натуральные киллеры (НК-клетки) являются одним из важных факторов естественной резистентности, которые не обладают функцией специфического распознавания, как это имеет место в случае действия Т-киллеров, цитотоксических антител или при антителозависимом клеточном киллинге [Покровский В.И., Гордиенко С.П., Литвинов В.Т., 1994]. При иксодовом клещевом боррелиозе, как и при других инфекциях, мишенями натуральных киллеров являются инфицированные клетки. Функцию распознавания клеток-мишеней они реализуют через выработку ИФН- γ , ИЛ-1, ИЛ-2, перфориноподобных молекул, а также через участие в процессах рецептор-опосредованной клеточной цитотоксичности [Соколов Е.И., 1998]. Конечным итогом активации НК-клеток является осуществление их киллерного потенциала с индукцией некротической гибели клеток-мишеней.

К окончанию острого периода заболевания у больных с эритемной формой ИКБ (серонегативный вариант) нами было отмечено статистически значимое увеличение (по сравнению с контрольными показателями) количества клеток,

экспрессирующих CD8+-антигены (рис. 1). По данным современной литературы, цитотоксические CD8+-лимфоциты играют особую роль в защите организма против бактерии, так как они способны вызывать деградацию патогена как на этапе его внеклеточной локализации, так и уничтожая пораженные возбудителем клетки.

Через 6 месяцев (условное выздоровление) у больных с эритемной формой ИКБ (серонегативный вариант) отмечались, как показали проведенные нами исследования, разнонаправленные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов. Так, при сниженном содержании цитотоксических/CD8+-лимфоцитов регистрировалось достоверно превышавшее контрольные значения число CD16+- и CD72+-клеток (рис. 1). Известно, что важную роль во взаимодействии Т- и В-лимфоцитов играет ряд поверхностных рецепторов, обеспечивающих передачу костимулирующих сигналов. Такое взаимодействие усиливает пролиферацию Т-клеток, стимулирует продукцию цитокинов и образование цитотоксических Т-лимфоцитов, индуцированных антигеном [Соколов Е.И., 1998].

Особое внимание клиницистов привлекают безэритемные формы ИКБ, единичные случаи которых были выявлены еще в 1991 году [Волегова Г.М. и соавт., 1993]. Выраженный полиморфизм клинических проявлений безэритемных форм ИКБ не позволяет правильно поставить диагноз без специфических серологических исследований [Воробьева Н.Н. и соавт., 1995].

При оценке субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных с безэритемной формой ИКБ регистрировалось повышение количества CD16+- и CD72+-лимфоцитов (рис. 1). В отличие от больных с эритемной формой с серонегативным вариантом у наблюдавшихся нами пациентов, страдавших безэритемной формой ИКБ (серопозитивный вариант), отмечалась активация CD72+-В-клеток (рис. 1).

Как известно, важную роль в межклеточном взаимодействии клеток иммунной и других систем организма играют цитокины. При исследовании цитокинового паттерна лимфоцитарных клеток у больных с безэритемной формой ИКБ нами было выявлено значительное повышение базальной и стимулированной продукции ИФН- γ и ИЛ-10 (рис. 5).

Обнаружена способность боррелий инициировать синтез ИЛ-10 моноядерными лейкоцитами периферической крови и синовиальной жидкости [Haupl T. et al., 1997; Yin Z. et al., 1997; Giambartolomei G.H. et al., 1998]. Известно, что в начальной стадии инфицирования *Borrelia burgdorferi* главным источником ИЛ-10 являются моноциты и макрофаги как исполнительные элементы

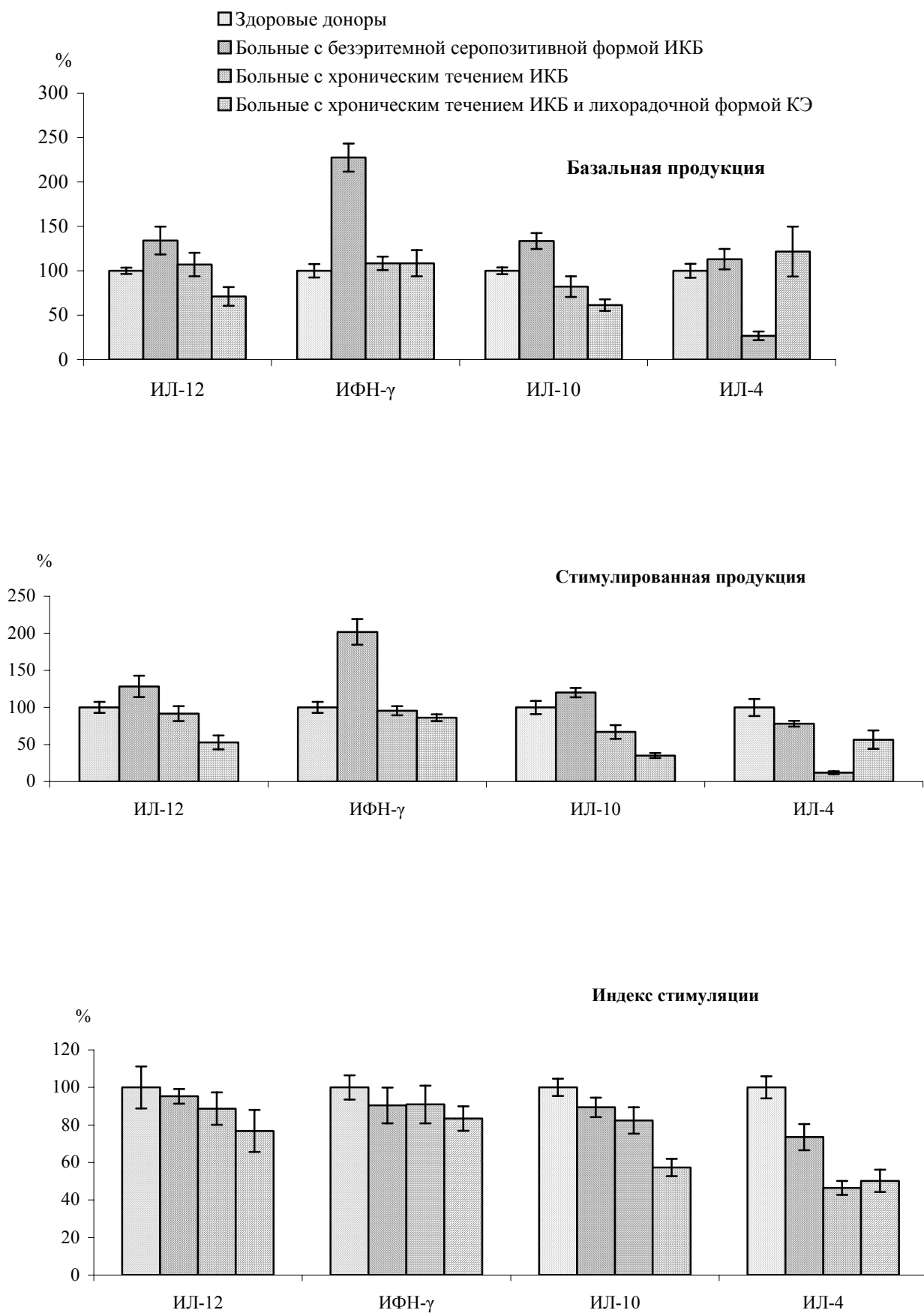


Рис. 5. Продукция цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом и с инфекцией-микст (по оси ординат - % от контрольных значений)

неспецифической, врожденной устойчивости до момента становления адаптивного иммунитета, в ходе которого этот цитокин может секретироваться другими типами клеток, включая Т- и В-лимфоциты [Moore K. et al., 1993; Ревякина В.А. и соавт., 2000]. Таким образом опосредуется механизм обратной связи для регуляции иммунных процессов и воспаления, индукция специфической толерантности к антигену. Не исключено, что обнаруженное нами снижение секреции ИЛ-4 у больных с безрителимой серопозитивной формой ИКБ обусловлено ингибирующим влиянием ИЛ-10 (рис. 5).

При обследовании больных ИКБ через 6 месяцев (условное выздоровление) нами было зарегистрировано достоверно значимое снижение содержания CD3⁺-лимфоцитов на фоне увеличения численного состава CD8⁺- и CD16⁺-клеток (рис. 1). Известно, что немалую долю Т-лимфоцитов представляют клетки, экспрессирующие CD4-антигены. Вероятно, снижение численности CD3⁺-лимфоцитов, выявленное нами в отдаленный период после острого боррелиоза, было обусловлено уменьшением количества Т-хелперной субпопуляции циркулирующих лимфоцитов. Элиминация Т-хелперов у условно выздоровевших пациентов (учитывая высокий уровень цитогенетически измененных Т-лимфоцитов) могла происходить, на наш взгляд, за счет реализации цитотоксических эффектов CD8⁺- и CD16⁺-клеток, содержание которых в отдаленный период оказалось повышенным. Другим возможным механизмом снижения количества CD3⁺-Т-лимфоцитов могла являться индукция апоптотической потенции клеток. Регуляция клеточной гибели важна для многоклеточного организма так же, как и контроль пролиферации клеток. В системе крови апоптоз представляет собой программное ограничение клеточной массы на всех ее уровнях – от клеток-предшественниц до зрелых клеток периферической крови с целью поддержания постоянства их численности, соотношения различных клеточных субпопуляций и элиминации из организма дефектных клеток [Лушникова Е.Ф., Загребин В.М., 1987].

Исследование реакции бласттрансформации лимфоцитов периферической крови (РБТЛ) на митогенное (ФГА, ЛПС) воздействие позволило выявить увеличение числа бластных форм клеток при бактериальной моноинфекции. Известно, что *Borrelia burgdorferi* индуцирует сложные клеточные и гуморальные иммунные ответы на различные белки спирохет у больных Лайм-боррелиозом [Dressler F. et al., 1993; Engstorm S.M. et al., 1995; Akin E. et al., 1999; Chen J. et al., 1999]. W.M. Whitmire et al. [1993], исследуя реакцию бласттрансформации В-

клеток у мышей при стимуляции экстрацеллюлярными мембранными образованиями и очищенными антигенами боррелий, которые содержат поверхностные белки OspA и OspB, обнаружили активацию бластогенеза в культуре клеток селезенки у наивных и инфицированных животных. Пролиферирующие клетки были идентифицированы как В-клетки, секретирующие поликлональные иммуноглобулины класса М (IgM), но не Ig классов G или A. Результаты этого исследования демонстрируют, что гуморальный ответ направлен преимущественно к экстрацеллюлярным мембранным образованиям, обладающих существенной неспецифической митогенной активностью, не присущей липополисахаридам или поверхностным липопротеинам OspA и OspB *Borrelia burgdorferi*.

Непосредственные причины хронизации инфекционного процесса связаны с врожденной или приобретенной функциональной неполноценностью клеток. Эта неполноценность может затрагивать разные функции клеток и проявляться снижением их адгезивных свойств, рефрактерностью к хемотаксинам и нарушением миграции в очаг, а также торможением микробицидных функций. Тенденция к хронизации наблюдается при дефектах лимфоцитов, которые вырабатывают не только специфические антитела – опсонины, но и серию цитокинов, модулирующих функции фагоцитов, в том числе стимулирующих последние и потенцирующих воспаление [Маянский А.Н., 1992]. Под влиянием ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α/β и других цитокинов, в образовании которых основное участие принимают Т-клетки и макрофаги, формируется тот патологический статус, который клинически воспринимается как хроническое воспалительное заболевание [Movat H.Z., 1988].

В частности, у обследованных нами пациентов с хроническим течением ИКБ отмечалось снижение активности кислой фосфатазы и гликогенпозитивных лимфоцитов в периферической крови (рис. 2).

Пониженная концентрация лизосомального фермента (кислой фосфатазы) в клетке может быть следствием иммуносупрессорного влияния боррелии, повреждения или функциональной незрелости иммуноцитов [Букринская А.Г., Жданов В.М., 1991; Плешко Р.И., 1988]. Сниженное содержание гликогена («аккумулятора» глюкозы) в клетках, по данным В.Ф. Стягова [1974], свидетельствует об угнетении процессов гликолиза.

Переход заболевания к хроническому течению обусловлен замедленным иммунным ответом, связанным с относительно поздней и слабо выраженной

боррелиемией, развитием аутоиммунных реакций и возможной миграцией боррелий внутрь клетки [Федоров Е.С. и соавт., 1999; Железникова Г.Ф. и соавт., 2002]. По данным Н. Ющук и соавт. [1996], *Borrelia burgdorferi* в организме человека локализуется преимущественно внеклеточно, однако способна инвазировать фибробласты, эндотелиальные клетки и макрофаги. О способности живых боррелий перистировать более 10 лет у нелеченных больных свидетельствуют данные И.А. Ивановой и соавт. [1997]. *Borrelia burgdorferi*, расположенные внутриклеточно, менее подвержены действию антибиотиков и специфических антител. Благодаря способности боррелий к длительной персистенции и наличию ряда перекрестных антигенов возбудителя с антигенами различных клеток хозяина реализуется участие аутоиммунного компонента в клинических проявлениях позднего периода ИКБ (артриты, кардиты, васкулиты, хронический дерматит и др.), имеющих сходство с ревматической патологией [Рахманова А.Т. и соавт., 1995; Антонова Т.В. и соавт., 2000].

В последние годы установлено, что ареал распространения ИКБ совпадает с клещевым энцефалитом (КЭ), что создает объективные предпосылки для микстинфицированности. У больных, зараженных боррелиями и вирусом клещевого энцефалита одновременно, развивается специфическая клиническая картина с симптомами, характерными для обеих инфекций, однако выраженность клинических проявлений отличается от таковых при моноинфекциях [Якушева С.С. и соавт., 2002]. Например, обращает на себя внимание укорочение средней продолжительности инкубационного периода при сочетанной инфекции в 2 раза по сравнению с ИКБ и КЭ.

Отличительной особенностью инфекции-микст от моноинфекции ИКБ, как показали результаты проведенных нами исследований, является то, что на 2-ой неделе заболевания у больных ИКБ, ассоциированным с клещевым энцефалитом, отмечалось уменьшение базальной и стимулированной секреции ИЛ-12 при сниженном количестве клеток, экспрессирующих CD8- и CD16-антигены (рис. 1, 5). Как известно, ИЛ-12 является основным провоспалительным цитокином, активирующим натуральные киллеры (CD16⁺-лимфоциты) и цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺-клетки). Мы предполагаем несколько механизмов, объясняющих пониженную секрецию ИЛ-12. Во-первых, ИЛ-12 является гетеродимером, состоящим из двух ковалентно (дисульфидно) связанных гликозилированных полипептидных цепей: тяжелой – 40 кД (p40) и легкой – 35 кД (p35), структура которых кодируется отдельными генами. Биологической

активностью, способностью индуцировать сигнал активации обладает только димер (p75). Возможно, присоединение конкурентной вирусной инфекции приводит к снижению экспрессии генов двух полипептидных цепей в синтезируемых популяциях иммунокомпетентных клеток.

Во-вторых, известно, что ИФН- γ через протеинтирозинкиназный путь трансдукции сигнала активации индуцирует выработку ИЛ-12. Кроме того, по данным И.С. Фрейдлин [1999], ИЛ-12 в синергизме с ИЛ-4 стимулирует пролиферацию натуральных киллеров (CD16⁺-лимфоциты). Однако у микст-инфицированных больных (согласно нашим данным) регистрировалось снижение стимулированной продукции ИЛ-4 и индекса стимуляции ИФН- γ по сравнению с контрольными показателями (рис. 5). Уменьшение продукции провоспалительных цитокинов у больных с энцефалитно-боррелиозным микст-заболеванием является благоприятным признаком развития инфекционного процесса, так как неконтролируемый синтез этих цитокинов может вызвать чрезмерную активацию клеточно-опосредованного иммунного ответа с развитием аутоиммунной патологии. Способность ИЛ-12 индуцировать созревание Th1, продукцию ими ИФН- γ делает этот цитокин ключевым в развитии Th1-опосредованных аутоиммунных заболеваний [Фрейдлин И.С., 1999].

К окончанию острого периода заболевания у обследованных нами больных с хроническим течением ИКБ, ассоциированным с КЭ, было выявлено повышенное содержание лимфоцитов, несущих CD16-антигены, на фоне отмеченного уменьшения продукции ИЛ-12 и ИФН- γ (рис. 1, 5). Вероятно, ИЛ-2, как синергист ИЛ-12, оказывая активирующее действие, способствовал усилению пролиферации натуральных киллеров. Увеличение содержания CD16⁺-лимфоцитов играет важную роль в осуществлении неспецифической защиты организма хозяина от внутриклеточных паразитов и обеспечивает иммунобиологический надзор за постоянством его клеточного состава, в частности, за числом CD3⁺- и CD4⁺-клеток.

Весьма интересными, на наш взгляд, являются результаты исследований ДНК-репаративной клеточной активности в зависимости от вариантов течения инфекционного процесса. Так, при хроническом (персистентном) характере вирусных инфекций независимо от таксономической характеристики возбудителя [тогавирусы (вирус краснухи), рабдовирусы (вирус бешенства), парамиксовирусы (вирус паратита), флавивирусы (вирус клещевого энцефалита)] отмечалось ингибирование процессов ресинтеза разрывов ДНК в клетках, обработанных

химическими канцерогенами, в частности, 4-нитрохинолиноксидом (4-НХО), и вырезания тиминовых димеров в опытах с УФО [Засухина Г.Д., 1979; Антоненко С.В. и соавт., 1981; Чекова В.В. и соавт., 1982]. Для ряда вирусов (осповакцины, кори, клещевого энцефалита, бешенства) при латентном типе течения вызываемого ими инфекционного процесса, напротив, было характерно либо отсутствие влияния, либо стимулирующее воздействие на репаративную активность обработанных мутагенами лейкоцитов периферической крови. Это позволило предположить, что механизмы формирования хромосомных нарушений в инфицированных вирусами клетках имеют свои особенности, хотя фенотипически они неотличимы от хромосомных aberrаций, вызываемых радиацией или химическими мутагенами.

Таким образом, обнаруженное нами существенное увеличение количества aberrантных лимфоцитов у больных, страдавших ассоциированной формой инфекции, по сравнению с аналогичными показателями у больных с бактериальной и вирусной моноинфекциями на фоне нормализации содержания клеток, выполняющих цитотоксические функции, свидетельствует о доминировании роли системы эксцизионной ДНК-репарации в механизмах формирования нестабильности хромосомного аппарата иммунокомпетентных клеток.

ВЫВОДЫ

1. У больных иксодовым клещевым боррелиозом и с инфекцией-микст (иксодовый клещевой боррелиоз в сочетании с клещевым энцефалитом) на фоне проводимой терапии регистрируются изменения функциональной активности лимфоцитов, степень выраженности которых зависит от этиологического варианта патологии.
2. Характерной особенностью иксодового клещевого боррелиоза при остром течении является увеличение количества CD16⁺-клеток в начале инфекционного процесса и уменьшение содержания гликогена в лимфоцитах на фоне Т-иммунодефицита (CD3⁺-лимфоциты) и запаздывание пролиферации CD72⁺-клеток. Дисбаланс субпопуляционного состава сохраняется в отдаленный период после иксодового клещевого боррелиоза. Хроническая персистенция боррелий индуцирует снижение количества цитотоксических Т-лимфоцитов.
3. Механизм иммунологических нарушений при инфекции-микст определяется преходящим уменьшением числа CD8⁺-, CD16⁺- и CD72⁺-лимфоцитов.

4. Структурно-организационные изменения хромосомного аппарата лимфоцитарных клеток у пациентов, страдающих иксодовым клещевым боррелиозом, наиболее выражены в начале острого периода заболевания и характеризуются увеличением (по сравнению с нормой) общего количества клеток с хромосомными aberrациями и числа хромосомных нарушений на клетку (преимущественно хроматидных разрывов) на фоне сниженной активности системы репарации ДНК.
5. Вирусно-боррелиозная инфекция характеризуется более выраженными цитогенетическими изменениями в лимфоцитах периферической крови, чем бактериальная моноинфекция.
6. Нарушения межклеточного взаимодействия при остром течении иксодового клещевого боррелиоза обусловлены повышенной секрецией ИФН- γ и ИЛ-10; при персистирующей бактериальной инфекции - уменьшением продукции ИЛ-10 и ИЛ-4. Присоединение вирусной инфекции на фоне хронического течения иксодового клещевого боррелиоза приводит к снижению секреции ИЛ-12.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Анализ функциональной активности лимфоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом и инфекцией-микст // Сборник научных трудов всероссийской научной конференции “Нервно-психическое утомление человека в современных условиях”, 13 – 15 ноября 2002. – Карачаевск, 2002. - С. 37-38 (в соавт. с Мельниковой А.П., Воронковой О.В., Михайловой О.В.).
2. Изучение активности системы мононуклеарных фагоцитов и полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом // Науки о человеке: третий конгресс молодых ученых и специалистов. Томск, 16 – 17 мая 2002 года. – Томск, 2002. – С. 90 – 91 (в соавт. с Пироговой Н.П., Воронковой О.В., Мельниковой А.П., Михайловой О.В., Киюциной Т.А.).
3. Изучение активности системы фагоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом // Компенсаторно-приспособительные процессы: фундаментальные и клинические аспекты. Материалы Всероссийской конференции. – Новосибирск, 4-6 ноября 2002 г. – с. 79-80 (в соавт. с Пироговой Н.П., Воронковой О.В., Мельниковой А.П.).
4. Иммунопатологические реакции у больных безэритемными формами иксодового клещевого боррелиоза // Новые технологии в иммунопрофилактике и терапии инфекционных заболеваний: Материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Санкт-Петербург, 28-30 октября, 2002. – С. 56-57 (в соавт. с Пироговой Н.П., Михайловой О.В.).
5. Митогенный потенциал лейкоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом // Сборник научных трудов всероссийской научной конференции “Нервно-психическое утомление человека в современных условиях”, 13 – 15 ноября 2002. – С. 21 (в соавт. Пироговой Н.П., Михайловой О. В.).
6. Оценка фагоцитарных способностей лейкоцитов периферической крови у больных клещевым энцефалитом и инфекцией-микст // Сборник научных трудов всероссийской научной конференции “Нервно-психическое утомление человека в современных условиях”, 13 – 15 ноября 2002. Карачаевск, 2002. – С. 32-34 (в соавт. с Пироговой Н.П., Михайловой О.В., Воронковой О.В., Мельниковой Н.П., Белоконь В.В.).

7. Продукция оксида азота мононуклеарными лейкоцитами периферической крови у больных клещевым энцефалитом и иксодовым клещевым боррелиозом // 4-й съезд физиологов Сибири. Тезисы докладов – Новосибирск, 2002. – С. 271 (в соавт. с Пироговой Н.П., Михайловой О.В., Мельниковой А.П., Воронковой О.В.).
8. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом // 4-й съезд физиологов Сибири. Тезисы докладов – Новосибирск, 2002. – С. 271 (в соавт. с Пироговой Н.П., Михайловой О.В.).
9. Фагоцитарная активность полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом // Современные аспекты биологии и медицины: Материалы городской научно-практической конференции, посвященной 40-летию Центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ. – Томск, 2002. – С. 93-95 (в соавт. с Пироговой Н.П., Воронковой О.В., Мельниковой А.П., Михайлова О.В.).
10. Функциональный статус фагоцитов периферической крови у больных иксодовым клещевым боррелиозом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Приложение №1. – 2002. – С. 52-55 (в соавт. с Пироговой Н.П., Воронковой О.В., Карповой М.Р., Барминой С.Э., Новицким В.В.).
11. Цитогенетический статус лимфоцитов периферической крови при длительной персистенции вируса клещевого энцефалита // Сборник научных трудов всероссийской научной конференции “Нервно-психическое утомление человека в современных условиях”, 13 – 15 ноября 2002. – С. 61 (в соавт. с Михайловой О.В., Жуковой О.Н., Пироговой Н.П., Мельниковой А.П., Воронковой О.В.).
12. Характеристика нейтрофильного и моноцитарного паттернов периферической крови при иксодовом клещевом боррелиозе // Бюллетень СО РАМН. – Новосибирск, 2003. - № 1. – С. 78-80 (в соавт. с Пироговой Н.П., Новицким В.В., Воронковой О.В.).