

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

Научный руководитель:

Екатерина Николаевна Ильинских

доктор медицинских наук

Томск - 2018

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Клещевой энцефалит (КЭ) является одной из наиболее распространенных природно-очаговых инфекций в Сибири и, в особенности, в Томской области (Удинцева И.Н. и соавт., 2010). 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, в особенности, очаговую формы (ОФ) этой инфекции (Иерусалимский А.П., 2001; Bogovic P. et al., 2015). Одной из трудных проблем диагностики КЭ является раннее распознавание ОФ, которую сложно прогнозировать в начале заболевания и отличить от тяжело протекающей МФ (Иерусалимский А.П., 2001; Bogovic P. et al., 2015). Выявление наиболее информативных прогностических критериев ОФ КЭ в начальном периоде заболевания потенциально может быть использовано для формирования групп повышенного риска тяжелого течения этой инфекции и способствовать совершенствованию диагностики КЭ.

К современным направлениям диагностики инфекционных заболеваний относится разработка математических моделей, диагностических алгоритмов и классификаторов, которые могли бы использоваться практическими врачами для формирования групп риска тяжелого течения и/или исходов этих болезней, включая лихорадку денге и иксодовый клещевой боррелиоз (Миноранская Н.С., 2015; Проворова В.В., 2010; Bogovic P. et al., 2015; Skogman V.H. et al., 2015; Tuan N.M. et al., 2015).

Кроме того, поскольку известно, что клинические формы инфекционных заболеваний, включая КЭ, могут иметь отличия по паттернам цитокинового статуса и других иммунологических показателей, а также по уровням активности окислительного стресса и цитогенетической нестабильности, то потенциально эти показатели также могут быть применены в качестве предикторов течения и исходов болезней (Крылова Н.В. 2014; Миронов И.Л., 2013; Ратникова Л.И. и соавт., 2014; Удинцева И.Н. и соавт., 2011). В частности, помимо оценки продукции цитокинов, в качестве таких дополнительных прогностических критериев может быть использовано определение продуктов перекисного окисления липидов, включая малоновый диальдегид (МДА), и, зачастую, связанные с ними показатели цитогенетической нестабильности, поскольку известно, что многие вирусные инфекции, включая КЭ, сопровождаются индукцией повреждений ДНК в различных типах соматических клеток, ассоциированных с интенсификацией окислительного стресса и активностью провоспалительных цитокинов (Новицкий В.В. и соавт., 2003; Moro-García M.A. et al., 2018; Ryan E.L. et al., 2016; Tawadrous G.A. et al., 2012). К факторам, от которых

может зависеть тяжесть клинического течения КЭ, также относят присутствие в генотипе больного определенных типов мутаций в некоторых генах, контролирующих иммунный ответ и антиоксидантную систему при инфекционных заболеваниях (Хасанова Г.М. и соавт., 2016; Fernandes R.C. et al., 2015; Barkhash A.V. et al., 2014).

Цель работы: выявить наиболее информативные клиничко-эпидемиологические, иммунологические и цитогенетические критерии прогнозирования повышенного риска тяжелых клинических форм острого клещевого энцефалита в начальном периоде заболевания.

В соответствии с целью были определены **задачи исследования:**

1. Выявить наиболее информативные клиничко-эпидемиологические и лабораторные прогностические критерии очаговой формы острого клещевого энцефалита в начальном периоде заболевания.
2. Идентифицировать наиболее значимые предикторы цитокинового статуса, окислительного стресса и цитогенетической нестабильности повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита в начальном периоде заболевания.
3. Определить взаимосвязь между активностью окислительного стресса, показателями цитокинового статуса и цитогенетической нестабильностью у больных острым клещевым энцефалитом.
4. Изучить влияние на уровень цитогенетической нестабильности носительства функционирующих или нефункционирующих вариантов генов глутатион-S-трансфераз (одной из наиболее важных групп ферментов системы антиоксидантной защиты) в генотипе больных острым клещевым энцефалитом.
5. Разработать на основе анализа клиничко-эпидемиологических данных, а также показателей цитокинового и цитогенетического статусов математические модели с целью формирования групп повышенного риска очаговой или менингеальной форм острого клещевого энцефалита в начальном периоде заболевания.

Научная новизна исследования. Впервые с применением пошагового бинарного логистического регрессионного анализа и ROC-анализа идентифицированы основные клиничко-эпидемиологические, иммунологические и цитогенетические прогностические критерии повышенного риска ОФ КЭ, на основе которых были разработаны математические модели прогноза МФ или ОФ острого КЭ в начальный период болезни. Кроме того, впервые были идентифицированы наиболее значимые предикторы повышенного риска ОФ КЭ на основе оценки активности окислительного стресса и уровня цитогенетической нестабильности: МДА, частота клеток буккального эпителия с микроядрами (МЯ) и частота Т-лимфоцитов с МЯ в культуре клеток периферической крови, а также некоторые параметры

цитокинового статуса. Более того, в результате проведенного исследования у больных КЭ впервые была выявлена взаимозависимость между концентрацией МДА, секрецией фактора некроза опухоли (ФНО)- α и уровнями клеток с цитогенетическими нарушениями. На примере ЛФ КЭ впервые была 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 исследования. Получены принципиально новые теоретические данные о взаимосвязи между показателями активности окислительного стресса, продукции провоспалительных цитокинов и уровнем хромосомных нарушений, что позволяет рассматривать активацию окислительного стресса как один из важных механизмов повышения уровня цитогенетической нестабильности при этой инфекции. Более того, получены знания фундаментального характера, свидетельствующие о том, что частота клеток с цитогенетическими нарушениями у больных КЭ зависит от присутствия в генотипе больного нефункционирующих генов глутатион-S-трансфераз *GSTM1*(0/0) и *GSTT1*(0/0).

Полученные в результате проведения настоящего исследования данные значительно расширяют представления о возможностях прогнозирования наиболее клинически тяжелой ОФ КЭ в начальном периоде заболевания. Идентифицированы наиболее значимые клинико-эпидемиологические и иммуноцитогенетические прогностические критерии и построены три взаимозаменяемые математические модели, позволяющие формировать группы риска ОФ или МФ КЭ в начальный период заболевания.

Результаты настоящей исследовательской работы могут быть использованы в учебно-методическом процессе на сертификационных циклах переподготовки и повышения квалификации врачей-инфекционистов.

Методология и методы исследования. Работа основана на использовании общенаучной методологии, включающей формально-логические и специфические методы. Исследование было выполнено в дизайне рандомизированного выборочного клинического исследования типа «случай-контроль» 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.

Степень достоверности результатов. Высокая степень достоверности данных, полученных в результате выполнения настоящей работы, обеспечена достаточным объемом

групп участников исследования, использованием современных методов, а также применением для обработки материала статистических компьютерных программ.

Легитимность исследования подтверждена решением Этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протоколы № 993 от 27.04.2009 г., № 4308 от 19.10.2015 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.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Принятие во внимание наиболее информативных клинико-эпидемиологических и лабораторных предикторов очаговой формы клещевого энцефалита в начальной стадии заболевания, а именно возраста больного, локализации присасывания клеща, наличия фоновых соматических заболеваний, показателей пульса, частоты дыхания, артериального давления, общего анализа крови, а также таких симптомов как оглушенность, дезориентация, появление спутанной речи, рвоты, грубой ригидности затылочных мышц, симптомов Кернига и Брудзинского позволит сформировать группы риска и существенно улучшить раннюю диагностику очаговой формы этой инфекции.
2. Показатели активности окислительного стресса, продукции некоторых цитокинов и цитогенетической нестабильности, включающие 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 иммунологическими прогностическими критериями повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита в начальной стадии болезни.
3. Уровень клеток с цитогенетическими нарушениями у больных клещевым энцефалитом зависит 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.

Апробация работы. Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на VII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2015); XV Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015); VIII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2016); IX Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2017); II Международном конгрессе «Инновационные технологии в иммунологии и аллергологии» (Москва, 2017); Научно-практической конференции «Избранные вопросы инфекционной патологии Урала и Западной Сибири» (Екатеринбург, 2017); X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 2018); V Конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (Новосибирск, 2018).

Декларация личного участия автора. Автором лично получены основные первичные данные, разработаны программа и дизайн исследования. Самостоятельно осуществлена статистическая обработка данных и написание текста диссертации и статей в журналы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 4 статьи – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах, состоит из введения, аналитического обзора литературы, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, практических рекомендаций, выводов и библиографического указателя, включающего 183 литературных источника (72 отечественных и 111 зарубежных). Работа иллюстрирована 19 таблицами и 12 рисунками.

ВЫВОДЫ

1. Эпидемиологическими и анамнестическими предикторами повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита являются: возраст больного старше 41 года, локализация укуса клеща в области головы и шеи, поздние сроки госпитализации больного более 6 дней после начала заболевания, а также наличие более двух фоновых соматических заболеваний, в особенности, сахарного диабета, гипертонической болезни и/или ишемической болезни сердца.

2. Среди клинических данных наиболее информативными прогностическими критериями повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита в начальном периоде болезни являются: частота пульса выше 90 в мин., частота дыхательных движений более 20 в мин., повышение температуры тела выше 39,5°C, систолическое и диастолическое давление выше 140 и 90 мм. рт. ст. соответственно, а также такие симптомы как оглушенность, дезориентация, появление спутанной речи, рвоты, грубой ригидности затылочных мышц, симптомов Кернига и Брудзинского.
3. Лабораторными предикторами повышенного риска очаговой формы клещевого энцефалита в начальном периоде болезни можно считать: относительную лимфопению, нейтрофильный лейкоцитоз с палочкоядерным сдвигом влево в лейкоцитарной формуле, повышение показателя СОЭ и увеличение концентрации глюкозы в крови.
4. К значимым иммунологическим и цитогенетическим предикторам очаговой формы клещевого энцефалита в начальном периоде болезни 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.
5. Уровень клеток с цитогенетическими нарушениями у больных клещевым энцефалитом зависит 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.
6. Разработанные математические модели на основе анализа эпидемиологических, клинических, иммунологических и цитогенетических показателей позволяют формировать в начальном периоде заболевания группы пациентов с повышенным риском развития очаговой или менингеальной форм клещевого энцефалита.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ильинских, Е.Н. Особенности пролиферативного ответа Т-лимфоцитов периферической крови у больных острым клещевым энцефалитом / Е.Н. Ильинских, О.И. Галактионова, Е.В. Замятина // Журнал инфектологии. – 2015. – Т. 13, Приложение № 1. – С. 138 – 139.
2. Ильинских, Е.Н. Продукция цитокинов, активация окислительных процессов и индукция цитогенетических нарушений у больных иксодовым клещевым боррелиозом и клещевым энцефалитом / Е.Н. Ильинских, Е.В. Замятина, О.И. Галактионова // Медицинская Иммунология. – 2015. – Т. 17, Специальный выпуск. – С. 111.
3. Ильинских, Е.Н. Оценка реакции бласттрансформации лимфоцитов периферической крови больных острым клещевым энцефалитом / Е.Н. Ильинских, Е.В. Замятина, Н.Н. Ильинских // Журнал инфектологии. – 2016. – Т. 14, Приложение № 1. – С. 119.
4. Замятина, Е.В. Оценка продукции цитокинов лимфоцитами периферической крови больных острым клещевым энцефалитом / Е.В. Замятина, Е.Н. Ильинских, Н.Н. Ильинских // Журнал инфектологии. – 2016. – Т. 14, Приложение № 1. – С. 105.
5. Патологические изменения клеток буккального эпителия и эритроцитов крови у больных клещевым энцефалитом / Е.Н. Ильинских, Н.Н. Ильинских, Е.В. Замятина и др. // Журнал инфектологии. – 2017. – Т. 15, Приложение № 1. – С. 114.
6. Продукция цитокинов, апоптоз мононуклеарных клеток и активация окислительных процессов у больных различными клиническими формами острого клещевого энцефалита / Е.Н. Ильинских, Е.В. Замятина, Н.Н. Ильинских, В.С. Полежаев // Аллергология и иммунология. – 2017. – Т. 18, №1. – С. 54.
7. Анализ клинико-эпидемиологических данных и микроядерного теста у больных с различными клиническими формами клещевого энцефалита / Е.В. Замятина, Н.Н. Ильинских, Е.Н. Ильинских, В.С. Полежаев // Журнал инфектологии. – 2017. – Т. 9, №2. – С.44 – 45.
8. Ильинских, Н.Н. Цитогенетические последствия клещевого энцефалита и полиморфизм генов глутатион-S-трансферазы у жителей Томской области / Н.Н. Ильинских, Е.Н. Ильинских, Е.В. Замятина // Журнал инфектологии. – 2017. – Т. 9, №2. – С.46 – 47.
9. Цитогенетические последствия микст-или моноклещевых инфекций в зависимости от вариантов генов глутатион-S-трансферазы (*GSTM1* или *GSTT1*) в генотипе больного / Н.Н. Ильинских, Е.Н. Ильинских, Е.В. Замятина, В.П. Зуевский // Журнал инфектологии. – 2017. – Т. 9, № 4. – С. 37 – 42.
10. Количественная оценка тяжести острого клещевого энцефалита / Е.Н. Ильинских, Н.Н. Ильинских, Е.В. Замятина, В.С. Полежаев // Журнал инфектологии. – 2018. – Т. 16, Приложение № 1. – С. 87.
11. Ильинских, Е.Н. Клинические прогностические критерии очаговой формы острого клещевого энцефалита / Е.Н. Ильинских, Н.Н. Ильинских, Е.В. Замятина // В мире научных открытий. – 2018. – Т. 10, №4. – С. 51 – 71.
12. Иммуноцитологические прогностические критерии острого клещевого энцефалита / Е.Н. Ильинских, Е.В. Замятина, Н.Н. Ильинских, В.С. Полежаев // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – № 2. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=27486>
13. Ильинских, Е.Н. Лабораторные прогностические критерии очаговой формы острого клещевого энцефалита / Е.Н. Ильинских, Е.В. Замятина, Н.Н. Ильинских // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. – 2018. – № 4. – С. 142-147.
14. Ильинских, Е.Н. Иммунологические и цитогенетические прогностические критерии очаговой формы клещевого энцефалита / Е.Н. Ильинских, Е.В. Замятина, Н.Н. Ильинских // Журнал инфектологии. – 2018. – Т. 10, № 2. – С. 51 – 52.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГБ – гипертоническая болезнь

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз

ИЛ – интерлейкин

ИФ – интерферон

ИФА – иммуноферментный анализ

КЭ – клещевой энцефалит

ЛФ КЭ – лихорадочная форма клещевого энцефалита

МДА – малоновый диальдегид

МФ КЭ – менингеальная форма клещевого энцефалита

МЯ – микроядра

ОШ – отношение шансов

ОФ КЭ – очаговая форма клещевого энцефалита

ОФЛИ – очаговая форма клещевого энцефалита с летальным исходом

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ФГА – фитогемагглютинин

ФНО- α – фактор некроза опухоли

Ig – иммуноглобулин

ROC-анализ – англ. receiver operating characteristic

Th – Т-хелперы