

УДК 618.1-006.52-086.37

Н.Б. Серeda¹, Е.В. Маркелова², В.Г. Серeda³

¹ Медицинский центр «Инномед-плюс» (690002 г. Владивосток, ул. 2-я Круговая, 10), ² Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ³ Станция скорой медицинской помощи г. Владивостока (690002 г. Владивосток, Океанский пр-т, 155)

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТОПИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНОМ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ГЕНИТАЛИЙ У ЖЕНЩИН

Ключевые слова: папилломавирус, эрозия шейки матки, иммунитет, иммунотерапия.

При клинико-иммунологическом обследовании 72 женщин с псевдоэрозией шейки матки и папилломавирусной инфекцией выявлены нарушения в Т-клеточном звене иммунного ответа. Предлагается метод топической терапии с использованием рекомбинантного α -интерферона в составе комплексного лечения. На собственном материале показан хороший клинический эффект, сокращение сроков лечения, супрессия репликации вируса папилломы человека на фоне снижения степени иммунологического дисбаланса организма.

Среди вирусных инфекций, поражающих аногенитальную область, вирус папилломы человека является одним из наиболее распространенных. Учитывая затраты на проведение диагностики и лечения всех видов патологии, обусловленных папилломавирусом, эту инфекцию считают самой «дорогостоящей» после ВИЧ-инфекции [1, 2, 5, 7, 8].

Целью нашего исследования явилось клинико-иммунологическое обоснование и оценка эффективности топической α -интерферонотерапии у женщин с урогенитальной папилломавирусной инфекцией.

Материал и методы. Клинические и лабораторные данные проанализированы у 72 женщин 18–45 лет с эрозией шейки матки, у которых в процессе обследования и лечения в амбулаторных условиях в эпителии шейки матки был обнаружен вирус папилломы человека. Контролем служили данные, полученные при клинико-иммунологическом обследовании 30 здоровых женщин аналогичного возраста.

Диагностика патологии половых органов включала в себя проведение осмотра, расширенной кольпоскопии на цифровом кольпоскопе с использованием программы MultiDoctor, цитологическое исследование эпителиальных клеток цервикального канала с окраской мазков по Романовскому и Папаниколу, гистологическое исследование биоптатов шейки матки.

Диагностика папилломавирусной инфекции у женщин и постановка диагноза основывались на молекулярно-биологической идентификации (полимеразная цепная реакция с типоспецифическими и видоспецифическими праймерами, амплификация сигнала, технология Real-Time PCR) в клетках цилиндрического и многослойного плоского эпителия шейки матки с определением клинически значимой концентрации 14 типов ДНК вируса (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66-й). При этом 16, 18, 31, 33 и 39-й типы являются вирусами высокого он-

когенного риска, а 35, 52, 56, 58, 59-й типы относят как в группу с высоким, так и в группы со средним и низким онкогенным риском [2, 3, 5, 8, 11].

Учитывая, что наиболее распространенные жалобы в виде белей, зуда и жжения могут служить симптомами более 20 заболеваний, все женщины были обследованы на наиболее распространенные урогенитальные инфекции. Взятие материала проводилось одновременно из правого переднебокового свода влагалища, уретры и шейки матки.

Исследование иммунофенотипа лимфоцитов по кластерам дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD) выполняли с помощью реакции иммунолюминесценции. Определялось содержание цитокинов – интерлейкина-4 (ИЛ4), фактора некроза опухоли- α (ФНО α), рецептора I типа к ФНО α , матриксной металлопротеиназы-9 секреторного типа в соотношении с ее тканевым ингибитором (чММП-9/ТИМП-1) в сыворотке крови с использованием специфических тест-систем R&D diagnostics Inc методом твердофазного иммуноферментного анализа. Статистическая обработка всех данных осуществлялась методами параметрической и непараметрической статистики. Наибольшее применение в работе нашли непараметрические критерии Mann–Whitney и Spearman.

Результаты исследования. Причинами обращения женщин в 61 случае (84,7%) явились жалобы на наличие новообразований в области наружных половых органов, бели, зуд и жжение в вульве. 5 человек обратились за консультацией по поводу контрацепции, 6 женщин были направлены на плановую кольпоскопию. При осмотре наружных половых органов в 28 случаях выявлены папилломатозные образования слизистой оболочки и кожи наружных половых органов. Еще в 2 других случаях обнаружены участки гиперкератоза и депигментации слизистой оболочки вульвы. В 25 наблюдениях диагностировано сочетание эрозии со смешанными образованиями шейки матки (кондилома, полип, киста, лейкоплакия), в том числе у 5 человек обнаружено сочетание эрозии и кисты шейки матки с лейкоплакией и/или кондиломой. Частота сочетания эрозий и смешанных образований шейки матки достоверно нарастала с возрастом обследованных женщин ($r=0,32$).

В результате цитологического исследования в 56 случаях (77,8%) выявлены различной степени выраженности изменения морфологии эпителия, в том числе у 47 женщин – за счет воспаления. В 9 случаях

отмечена слабая или умеренная степень дисплазии. У 16 женщин с эрозией шейки матки, в том числе у 2 в сочетании со смешанными образованиями, изменений морфологической картины эпителия цервикального канала не выявлено. Корреляционный анализ показал, что при сочетании эрозии со смешанными образованиями шейки матки отмечалось достоверное нарастание морфологических изменений клеточных элементов ($r=0,30$), особенно при сочетании полипа с эрозией шейки матки ($r=0,38$).

По данным полимеразной цепной реакции у женщин с эрозией шейки матки идентифицированы 8 типов папилломавируса. В 49 случаях найдены высокоонкогенные штаммы – 16, 18, 31 и 33-й. Наиболее часто выявлялся 16-й (табл. 1). Ассоциации двух типов вируса зафиксированы у 21 пациентки. Одним из ассоциантов являлись высокоонкогенные 16-й или 18-й типы, в том числе у 10 женщин выявлены ассоциации только высокоонкогенных типов (16, 18 и 31-го).

Различные урогенитальные инфекции в ассоциации с вирусом папилломы человека диагностированы у 63 женщин (87,5%). Зафиксирован высокий удельный вес цитомегаловирусной инфекции, генитального герпеса, уреаплазмоза. Одновременное выявление 2–3 типов герпесвирусов зафиксировано у 32 человек, в том числе герпесвируса-2 и цитомегаловируса – у 15, герпесвирусов 2 и 6 – у 2, герпесвируса 6 и цитомегаловируса – у 3, герпесвирусов 2, 6 и цитомегаловируса – у 2. Сочетание герпесвирусов с другими урогенитальными инфекциями констатировано у 28 обследованных. Другие урогенитальные инфекции (микоплазмоз, уреаплазмоз, хламидиоз, трихомониаз) выявлены у 33 человек (табл. 2). Корреляционный анализ не выявил взаимосвязи между выраженностью морфологических изменений клеток эпителия цервикального канала и антигенной нагрузкой в результате ассоциации урогенитальных инфекций.

Число лейкоцитов крови у обследованных зафиксировано на уровне $5,07 \pm 0,2 \times 10^9$ /л. Лейкопения выявлена у 26% женщин. Фагоцитарный индекс, указывающий на участие нейтрофилов в фагоцитарной защите, составил $45,4 \pm 1,7\%$ и был снижен у 90% обследованных. Аналогичные закономерности отмечены в отношении качества фагоцитоза: фагоцитарное число колебалось на уровне $3,96 \pm 0,2$ и было ниже границы нормы у 86% женщин. Показатели фагоцитарного индекса достоверно коррелировали с показателями фагоцитарного числа ($r=0,7$). При этом активность фагоцитов и качество фагоцитоза с возрастом снижались.

Изучение основных популяций иммунокомпетентных клеток обнаружило снижение относительного количества Т-лимфоцитов до $43,3 \pm 1,4\%$ (контроль – $70,2 \pm 2,2\%$). Несмотря на значительный разброс относительных показателей CD22⁺-клеток (11–46%), отмечен рост их среднего уровня с $14,8 \pm 1,3$ до $21,7 \pm 1,03\%$.

Таблица 1

Типы папилломавируса у женщин с псевдоэрозиями шейки матки

Тип вируса	Частота выявления	
	абс.	%
6	20	27,8
16	35	48,6
18	15	20,8
31	5	6,9
33	2	2,8
35	3	4,2
52	12	16,7
56	2	2,8

Таблица 2

Частота урогенитальных инфекций у женщин с псевдоэрозией шейки матки, инфицированных папилломавирусом

Инфекционный агент	Частота выявления	
	абс.	%
<i>Herpes simplex virus 1</i>	0	0,0
<i>Herpes simplex virus 2</i>	36	50,0
<i>Varicella-zoster virus</i>	1	1,4
<i>Cytomegalovirus</i>	38	52,8
<i>Human herpesvirus 6</i>	16	22,2
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	31	43,1
<i>Mycoplasma hominis</i>	9	12,5
<i>Mycoplasma genitalis</i>	2	2,8
<i>Chlamidia trachomatis</i>	3	4,2
<i>Trichomonas vaginalis</i>	2	2,8

Абсолютные и относительные показатели количества иммунокомпетентных клеток коррелировали между собой, в связи с чем мы ориентировались на динамику изменений относительных количеств субпопуляций лимфоцитов.

Средний уровень Т-хелперов (CD4⁺) значительно снизился с $47,5 \pm 2,2$ до $31,7 \pm 0,7\%$, а Т-супрессоров (CD8⁺) – с $31,2 \pm 1,9$ до $21,8 \pm 1,2\%$. Вследствие выявленных однонаправленных изменений субпопуляционный индекс CD4⁺/CD8⁺ достоверно не изменился и составил $1,6 \pm 0,1$. Наблюдался рост уровня клеток CD25⁺ с рецептором для ИЛ-2 (с $9,1 \pm 0,8$ до $23,0 \pm 0,9\%$), количество клеток CD95⁺, причастных к апоптотической гибели лимфоцитов, увеличилось с $15,1 \pm 1,4$ до $28,1 \pm 0,7\%$. Концентрация натуральных киллеров (CD16⁺) и HLA-DR⁺-клеток существенно не менялась. На фоне изменений лимфоцитарного профиля отмечалось значимое снижение содержания иммуноглобулина G (с $10,7 \pm 0,2$ до $7,8 \pm 0,3$ г/л) и иммуноглобулина A (с $2,1 \pm 0,1$ до $0,9 \pm 0,1$ г/л), что свидетельствовало о функциональной недостаточности В-лимфоцитов.

В сыворотке крови отмечался достоверный рост уровня как ИЛ-4 (с $3,2 \pm 0,4$ до $73,3 \pm 31,6$, min–max 1,1–657,6 пг/мл), так ФНОα (с $4,2 \pm 1,2$ до $64,9 \pm 21,9$, min–max 0,7–576,4 пг/мл), а также увеличение числа рецепторов I типа к ФНОα (с $514,2 \pm 2,1$ до $677,0 \pm 18,5$,

min–max 534,1–802,1 пг/мл). Обращал на себя внимание значительный разброс значений уровней цитокинов с асимметричным распределением вариационного ряда. Выявлена прямая корреляция между числом CD25⁺-клеток и концентрацией ФНО α в сыворотке крови ($r=0,6$).

Известно, что патологические изменения обусловлены балансом между синтезом и деградацией компонентов внутриклеточного матрикса, металлопротеиназы влияют на процессы ремоделирования и ангиогенеза в очагах воспаления, а их ингибиторы – на деградацию матрикса. В результате изучения уровня соотношения чММП-9/ТИМП-1 в сыворотке крови был обнаружен достоверный его рост (до 7935,0 \pm 734,1 пг/мл) у больных с папилломавирусной инфекцией, по сравнению с группой здоровых женщин (220,0 \pm 70,0 пг/мл), притом что уровень соотношения чММП-9/ТИМП-1 коррелировал с относительным содержанием CD8⁺-клеток ($r=-0,4$). Наиболее существенное увеличение соотношения чММП-9/ТИМП-1 зафиксировано у больных с наличием вируса папилломы человека 16-го типа (8994,1 \pm 868,1) по сравнению с другими типами этого инфекта (6667,4 \pm 1220,0 пг/мл).

Выявленные клинико-иммунологические изменения позволили включить в программу терапии женщинам с папилломавирусной инфекцией, ассоциированной с группой герпесвирусов, липосомальную форму рекомбинантного интерферона альфа-2b (препарат «Реаферон-ЕС-Липинт», производства ЗАО «Вектор-Медика»).

Обследованные были разделены на две группы по 20 человек. В 1-й группе проводилась рекомендованная противовирусная терапия (валтрекс, циклоферон, виферон) в течение 10 дней. Во 2-й группе в программу терапии, наряду с противовирусным лечением системного действия (валтрекс) применялся рекомбинантный интерферон местно в виде аппликаций на область шейки матки, ежедневно по 500 тыс МЕ в течение 10 дней (побочных эффектов от местного применения иммуностропного препарата не выявлено).

В результате лечения во 2-й группе отмечалась более быстрая регрессия местных воспалительных изменений. Так, через 10 дней у 90 % больных (против 50 % женщин 1-й группы) купировались симптомы вагинита и уменьшились клинические проявления эндоцервицита. В течение 30 дней от начала лечения отмечена полная регрессия клинической симптоматики и явлений эндоцервицита. Полная эпителизация псевдоэрозий произошла через 30 дней у 50 % женщин, через 60 дней – у 75 %, а к 120 дням – у всех больных с констатацией 1-го класса цитологической картины.

Через 30–60 дней от начала лечения геном вируса папилломы человека в полимеразной цепной реакции не выявлен. При контрольном иммунологическом исследовании через 30 дней от начала лечения отмечена положительная динамика у большинства

женщин 2-й группы. Изменения со стороны Т-лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ зафиксированы только в 20 % случаев (против 80 % до начала лечения). Высокий уровень CD25⁺-клеток сохранился у 45 % пациенток (против 92 %, до начала лечения). В то же время содержание ИЛ4 (102,4 \pm 37,2 пг/мл) и ФНО α (89,7 \pm 27,3 пг/мл) в сыворотке крови в динамике оставалось высоким как до, так и после терапии с применением рекомбинантного интерферона.

Обсуждение полученных данных. Высокий уровень высокоонкогенных типов папилломавируса на фоне псевдоэрозии является неблагоприятным прогностическим признаком в отношении дисплазии шейки матки и ее трансформации в рак [5, 6, 9]. Полученные данные полностью согласуются с результатами других исследователей [1, 2]. Но в то же время анализ частоты обнаружения других типов вируса папилломы человека (6-й и 52-й типы – 32 женщины) с цитологическими и гистологическими результатами (от плоскоклеточной атипии и полиморфных изменений до дисплазии шейки матки) позволяет предполагать, что кроме онкогенности типа вируса пусковыми звеньями трансформации могут служить дефекты или «поломки» на уровне эпителиального матрикса и иммунного ответа при внутриклеточном паразитизме вируса [4, 11]. По данным ряда авторов, при развитии рака шейки матки уменьшается частота выявления комбинации двух и более типов папилломавируса и чаще – это единичная инфекция 16-го типа [11]. Положительный результат на ДНК вируса не позволяет диагностировать цервикальную неоплазию, но имеет большую прогностическую значимость для оценки канцерогенного риска [6, 10].

Несмотря на общепринятое мнение, что кондиломатоз аногенитальной области связан с 6-м и 11-м типами папилломавируса [1], в том числе наиболее часто (до 80 % случаев – с 6-м типом [6]), в нашем исследовании 11-й тип вируса вообще не был выявлен, а 6-й тип не определял развития кондиломатоза. Так, из 35 женщин с кондиломатозом наружных половых органов и шейки матки только у 9 обнаружен 6-й тип папилломавируса, в том числе в сочетании с 16-м типом – у 3 человек. Все кондиломы шейки матки были плоскими, что, по литературным данным, может являться проявлением цервикальной интраэпителиальной неоплазии и показанием для проведения гистологического исследования [6, 8]. Надо отметить, что ряд авторов связывает появление плоских кондилом на шейке матки с 16-м типом папилломавируса [7]. В 17 случаях на собственном материале (50 %) кондиломатоз диагностировался на фоне выявления 16-го типа вируса, в том числе у 8 женщин – в ассоциации с 18, 31, 35, 52 и 56-м типами. У 9 человек с кондиломатозом обнаружены 18, 52 и 56-й типы вируса.

Высокая степень ассоциации вируса папилломы человека с другими урогенитальными инфекциями,

в целом подтверждающая мнение других исследователей [2, 5, 8], позволяет обосновать включение в обязательное обследование женщин с эрозией шейки матки молекулярно-биологических методов выявления папилломавируса (с 10–14 типоспецифическими праймерами) и других урогенитальных инфекций, особенно герпесвирусов. Общеизвестно, что *Herpes simplex virus 2* относится к онкогенным вирусам, а *Cytomegalovirus* является мощным иммуносупрессором [1]. При этом тенденцию к росту частоты предрака и рака шейки матки объясняют ростом числа урогенитальных инфекций (особенно выявление *Herpes simplex virus 2* и *Cytomegalovirus*) как абсолютных патогенов и триггеров трансформации эпителия шейки матки, в котором присутствует высокоонкогенный вирус папилломы человека [9, 10].

Несомненно, дисбиоз влагалища является одним из самых важных факторов, способствующих неблагоприятному течению папилломавирусной инфекции, дисрегуляции иммунных механизмов защиты, тем самым определяя успех лечения как папилломавирусной инфекции, так и любой патологии шейки матки [8]. Клеточный иммунитет играет критическую роль в развитии папилломавирусной инфекции, и он более важен в развитии и регрессии генитальных изменений, чем гуморальный [11]. У женщин с воспалительно-дегенеративным поражением шейки матки, инфицированных папилломавирусом, обнаружен иммунный ответ с превалированием Т-хелперов 2-го типа на фоне угнетения фагоцитарной активности и Т-клеточной недостаточности. Отмечена выраженная дисрегуляция ремоделирования эпителиального матрикса и неспособность восстанавливать целостность ткани, вследствие чрезмерной его деградации. Это является результатом неадекватной местной регуляции вирусоспецифического иммунного ответа за счет дисбаланса продукции цитокинов, с превалированием противовоспалительных медиаторов [4–8, 11]. Полученные результаты не подтвердили данные других исследователей о снижении соотношения $CD4^+/CD8^+$, а также уменьшении количества $CD25^+$ -клеток [5, 7]. Одновременное снижение числа клеток $CD4^+$ и $CD8^+$ в периферической крови может быть связано с инфильтрацией ими очагов папилломавирусной инфекции [6]. Определение содержания ИЛ-4 как маркера активности воспаления может способствовать определению прогноза неблагоприятного развития заболевания [11].

Выбор тактики лечения должен основываться на общих принципах, сформированных Я.В. Бохманом [9], и зависеть от формы папилломавирусной инфекции – характера и локализации очагов, степени дисплазии, состояния иммунной системы, типа онкогенности вируса и ассоциированности его с другими урогенитальными инфекциями. При выявлении типичных экзофитных кондилом и субклинических проявлений инфекции должна проводиться локаль-

ная деструкция. На собственном материале применялась радиочастотная деструкция (вапоризация) [2, 3, 6, 7]. Так как вирус папилломы человека сохраняется в эпителиальных клетках, использование деструктивных методов терапии не гарантирует от рецидивов заболевания [2, 5, 6]. Перспективным в этом плане является сочетание деструктивных методов лечения с коррекцией общих и местных нарушений иммунной защиты – лекарственными средствами, обладающими противовирусным, антипролиферативным и иммуномодулирующим действием [2, 3, 5, 6, 8]. В связи с высокой частотой ассоциации с другими урогенитальными инфекциями до начала лечения папилломавирусной инфекции, особенно при применении инвазивных методов, необходимо проводить терапию этих инфекций. Адекватное лечение урогенитальных инфекций является мерой профилактики развития осложнений и рака шейки матки, так как современными исследованиями выявлен более высокий пролиферативный и пластический потенциалы эпителия в очаге поражения шейки матки у больных с признаками инфицирования нижнего отдела половой системы [8, 9]. Одной из наиболее перспективных групп препаратов, воздействующих на состояние иммунной системы, являются интерфероны. Они позволяют активировать защитные реакции организма, блокировать неблагоприятное биологическое действия цитокинов и их рецепторов, усилить противоопухолевый иммунитет. Субклинические очаги папилломавирусной инфекции аногенитальной области, цервикальные внутриэпителиальные неоплазии, особенно вызванные папилломавирусом высокого онкогенного риска, являются показанием для наружного применения интерферонов [1, 8, 11].

Предлагаемый метод терапии женщин, инфицированных папилломавирусом, с воспалительно-дегенеративными поражениями шейки матки с применением иммунотропного препарата на основе липосомального α -интерферона «Реаферон-ЕС-Липинт» местно в виде аппликаций на область шейки матки в комплексе с противовирусным лечением дает хороший клинический результат, сокращает сроки лечения, супрессирует репликацию вируса папилломы человека с его элиминацией на фоне снижения степени иммунологического дисбаланса организма в целом.

Литература

1. Белозеров Е.С., Буланьков Ю.И. *Терапия вирусных инфекций. Элиста: Джангар, 2007. 104с.*
2. Дмитриев Г.А., Биткина О.А. *Папилломавирусная инфекция. М.: Медицинская книга, 2006. 80 с.*
3. *Заболевания шейки матки: современные методы диагностики и лечения: учебное пособие / под ред. Т.С. Качалина. Нижний Новгород: Изд-во НГМА, 2006. 96 с.*
4. Кисилев В.И., Ляшенко А.А. *Индиол – регулятор пролиферативных процессов в органах репродуктивной системы. М.: МираксФарма, 2005. 48 с.*
5. *Папилломавирусная инфекция: диагностика, лечение и профилактика / Прилепская В.Н., Роговская С.И., Кондриков Н.И., Сухих Г.Т. М.: МЕДпресс-информ, 2007. 32 с.*

6. Папилломавирусная инфекция — клиника, диагностика, лечение: пособие для врачей / Молочков В.А., Кисилев В.И., Рудых И.В., Щербо С.Н. М.: Мириада Вива, 2005. 32 с.
7. Папилломавирусная инфекция гениталий у женщин: учебное пособие / под ред. В.И. Кулакова и др. М.: Изд-во НЦАГ и П РАМН, 2007. 48 с.
8. Роговская С.И. Папилломавирусная инфекция у женщин и патология шейки матки: руководство для практикующего врача. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. 144 с.
9. Русакевич П.С., Литвинова Т.М. Заболевания шейки матки у беременных: диагностика, лечение, мониторинг, профилактика М.: Медицинское информационное агентство, 2006. 144 с.
10. Сидорова И.С., Леваков С.А. Фоновые и предраковые процессы шейки матки. М.: Медицинское информационное агентство, 2001. 100 с.
11. Эпителиальные дисплазии шейки матки: диагностика и лечение / Подинов Ю.И., Лактинов К.П., Петровичев Н.Н., Брюзгин В.В. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 136 с.

Поступила в редакцию 20.04.2009.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL SUBSTANTIATION OF TOPICAL THERAPY FOR WOMEN'S GENITAL TRACT PAPILLOMAVIRUS INFECTION WITH ALPHA INTERFERON

N.B. Sereda¹, E.V. Markelova², V.G. Sereda³

¹ Medical Centre "Innomed-plus" (10 2nd Krugovaya St.

Vladivostok 690002 Russia), ² Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia),

³ Vladivostok First Aid Station (155 Okeanskiy Av. Vladivostok 690002 Russia)

Summary — Clinical immunological examination of 72 women with cervical pseudoectropion and papillomavirus infection revealed disorders in T-cell component of the immune response. The authors suggest applying a topical treatment method via recombinant interferon alfa as part of the comprehensive treatment. This will ensure good clinical effect, reduction of treatment period, suppression of the papillomavirus replication, and abatement of immunological imbalance of human organism.
Key words: papillomavirus, cervical ectropion, immunity, immunotherapy.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 1, p. 60–64.

УДК 576.851.45:616.981.455-085.33:582.28

А.М. Шариков¹, Н.В. Пашенова², Д.А. Нешумаев¹, И.А. Новицкий¹

¹ Институт медицинских проблем Севера СО РАМН (660022 г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г),

² Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (660036 г. Красноярск, Академгородок № 50, стр. 28)

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГРИБА ЧАГИ В ОТНОШЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

Ключевые слова: метаболиты высших грибов, бактерицидное действие.

Изучали влияние метаболитов гриба-чаги *Inonotus obliquus* Pilat методом лунок на штамм *Francisella tularensis* линии 15 НИИЭГ. Обнаружен бактерицидный эффект, сохраняющийся при значительном разведении. Для идентификации компонентов, ингибирующих рост возбудителя туляремии, требуются дальнейшие исследования.

Антибиотическая активность высших грибов была показана в 70-е годы прошлого века [1], но поиск и выделение мощных антибиотиков из метаболитов некоторых макромицетов представляется актуальным и в наши дни [7]. Антибиотические вещества гриба *Inonotus obliquus* Pilat мало изучены, хотя антимикробная активность препаратов чаги упоминается в специальной и популярной литературе [4].

Широкое распространение природных очагов туляремии в нашей стране требует совершенствования средств профилактики, диагностики и лечения данного заболевания. В настоящее время описаны некультивируемые формы *Francisella tularensis*, длительно персистирующие в макроорганизме [3, 8, 9]. Установлен факт перехода возбудителя в авирулентную форму с изменением его антигенной структуры [5].

Целью данной работы явился анализ влияния метаболитов гриба *I. obliquus* Pilat на штамм *F. tularensis* линии 15 НИИЭГ.

Шариков Андрей Михайлович — научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии НИИ МПС СО РАМН; тел. +7 (913) 529-01-63.

Материал и методы. Использовали сибирский изолят *I. obliquus*, выделенный в 2004 г. из пораженной древесины березы в окрестностях Красноярск. Посевной материал чаги выращивали в чашках Петри на сусло-агаре (4°Б). Грибной мицелий выращивали в жидкой среде — неохмеленное пивное сусло (4°Б) с рН 5,13. Жидкие среды засеивали агаровыми блоками с выращенным мицелием (диаметр — 9 мм), вырезанными из края грибной колонии пробочным сверлом. В каждую колбу помещали по пять блоков.

Засеянные колбы инкубировали в термостате при 22–24°С в течение 32 дней. Одновременно инкубировали колбы со стерильной средой (контроль). Культивирование повторяли трижды. После измерения объема и уровня водородного показателя собранную культуральную жидкость упаривали в фарфоровых чашках в токе теплого воздуха до состояния густого сиропа. Для проведения теста на антибиотическую активность брали чашку с упаренной средой (сусло) и чашку с культуральной жидкостью (сусло + чага). Содержимое каждой чашки растворяли в дистиллированной воде (рН 6,18), доводя конечный объем до 100 мл. Полученные растворы сусла (контроль 1) и культуральной жидкости гриба *I. obliquus* (опыт) разводили стерильно в пробирках в 10, 100 и 1000 раз.

Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ засеивали на FT-агар, инкубировали в течение 3 суток в термостате при 37°С. Выросшие изолированные