

*На правах рукописи*

**Долина Анна Борисовна**

**ОСОБЕННОСТИ ИММУНИТЕТА, ПЕРЕКИСНОГО  
ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ЛЕЙКОЦИТАРНО-  
ТРОМБОЦИТАРНО-ЭРИТРОЦИТАРНЫХ  
ВЗАИМООТНОШЕНИЙ ПРИ ВТОРИЧНОМ  
ИНФЕКЦИОННОМ ЭНДОКАРДИТЕ У ДЕТЕЙ**

14.03.03 - патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Чита - 2010

Работа выполнена в ГОУ ВПО "Читинская государственная медицинская академия Росздрава".

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор, заслуженный деятель  
науки РФ

**Кузник Борис Ильич**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Горбунов Владимир Владимирович**

кандидат медицинских наук **Батожаргалова Баирма Цыдендамбаевна**

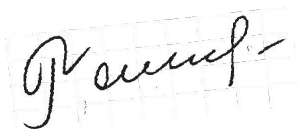
**Ведущая организация:** ГОУ ВПО "Алтайский государственный медицинский университет Росздрава", г. Барнаул.

Защита состоится " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2010 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.118.01 при ГОУ ВПО "Читинская государственная медицинская академия Росздрава" (672090, г.Чита, ул. Горького, 39-а).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО "Читинская государственная медицинская академия Росздрава".

Автореферат разослан " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2010 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
д. м. н., профессор



**И.Н. Гаймоленко**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Несмотря на стремительное развитие кардиохирургии детского возраста, проблема инфекционного эндокардита (ИЭ) сохраняет свою актуальность. В последнее время частота ИЭ у больных с врожденными пороками сердца (ВПС) увеличилась вдвое, составляя при этом 2,8-5,8% от общего числа госпитализированных больных с ВПС, а на 1280 всех педиатрических госпитализаций в год приходится по 1 ребенку с ИЭ (Шевченко Ю.Л. и др., 2000; Караськов А.А., 2003; Тюрин В.П., 2005; Гаджиев А.А. и др., 2006; Ferrieri P. et al., 2002).

Переход от когда-то монопольного термина септического эндокардит к более широкому понятию инфекционный эндокардит означает не только расширение перечня возбудителей, но и принципиальное признание того, что не всегда эндокардит прямо или косвенно вписывается в программу сепсиса, а может протекать в рамках ограниченного воспалительного очага инфекционной природы, хотя и внутри кровяного русла (Исаков Ю.Ф., Белобородова Н.В., 2001; Хабиб О.Н. и др., 2004; Гаджиев А.А. и др., 2006; Дюжиков А.А. и др., 2007).

Трансформация клинической картины заболевания в малосимптомные проявления, противоречивые лабораторные данные, а также высокая частота отрицательной гемокультуры затрудняют своевременную диагностику и лечение данной патологии, что в дальнейшем определяет неблагоприятный прогноз заболевания (Буткевич О.М., Виноградова Т.Л., 2001; Белозеров Ю.М., 2004; Хоффман Д., 2006; Tissieres P. et al., 2003).

Изучение иммунитета при ИЭ проводится достаточно интенсивно, однако, интерпретация его результатов сложна в связи с неоднородностью получаемых разными авторами результатов, а также широкой вариабельностью иммунологических показателей (Гуревич М.А. и др., 2001; Савченко Р.П. и др., 2001; Л.И.Виницкий и др., 2001; М.В.Леган и др., 2002; Тюрин В.П., 2002; Поляков В.П. и др., 2007).

За последние годы в клиническую практику с успехом внедрен тест лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА), характеризующий сдвиги в иммунной системе и гемостазе (Витковский Ю.А. и др., 1999-2010; Солпов А.В., 2002-2005; Кузник Б.И. и др., 2006, 2007, 2009). В настоящее время установлено, что с тромбоцитами и лейкоцитами способны взаимодействовать эритроциты (Бурячковская Л.И. и др., 2004; Коричкина Л.Н. и др., 2004; Волков В.С. и др., 2005; Бельченко Д.И. и др., 2005; Кузник Б.И. и др., 2008, 2010), образуя лейкоцитарно-эритроцитраные (ЛЭА) и эритроцитарно-тромбоцитарные агрегаты (ЭТА). Эндогенное ауторозеткообразование при различных патологических состояниях рассматривается как один из механизмов наруше-

ния микроциркуляции, а также иммунологических и гемостатических сдвигов. Однако, при ИЭ эти показатели не изучались. Подобные наблюдения помогли бы во многом пролить свет на механизм сдвигов, возникающих в иммунитете и гемостазе у детей, больных ИЭ.

Несмотря на огромное количество новых антибиотиков, появившихся за последние 10 лет, задача успешного лечения ИЭ не стала легче (Чучалин А.Г., 1989; Вельтищев Ю.Е., 1996; Koh Y.Y. et al., 1997). Консервативный и хирургический методы лечения ИЭ на протяжении последнего десятилетия остаются предметом активной дискуссии (Резник И.И. и др., 2002; Буткевич О.М., Виноградова Т.Л., 2005; Гаджиев А.А. и др., 2007; Поляков В.П. и др., 2007). Вместе с тем многие исследователи (Петров Р.В. и др., 1997; Ярилин А.А., 1999; Морозов В.Г. и др., 2000; Хаитов Р.М., 2001, 2002, 2005; Кузник Б.И., 2008) считают, что иммуномодулирующие препараты должны дополнять стандартную терапию заболеваний, сопровождающихся сдвигами в клеточном и гуморальном звеньях иммунитета.

До сих пор при лечении ИЭ практически не использованы методы терапии, направленные на устранение дефектов в иммунитете. У нас есть все основания предполагать, что хороший терапевтический эффект при ИЭ может быть достигнут при использовании тимомиметика - тималина, обладающего иммуномодулирующим и репаративным действием (Жигжитова Е.Б. и др., 1999; 2000; Лиханов И.Д., 2002; Цибенова Б.Д., 2003; Вишнякова Т.М., 2006; Земсков А.М. и др., 2007; Кузник Б.И. и др., 2001-2008, 2010).

Всё изложенное позволяет считать, что избранная нами тема кандидатской диссертации является актуальной как в теоретическом, так и практическом отношении.

**Цель исследования** - изучить особенности врожденного и адаптивного иммунитета, перекисного окисления липидов и лейкоцитарно-тромбоцитарно-эритроцитарных взаимодействий у детей, больных вторичным инфекционным эндокардитом.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Исследовать состояние клеточного и гуморального иммунитета, фагоцитарную активность лейкоцитов, синтез провоспалительных и противовоспалительных цитокинов у больных инфекционным эндокардитом.
2. Изучить состояние перекисного окисления липидов и антирадикальную защиту в эритроцитах и плазме у пациентов, страдающих инфекционным эндокардитом.
3. Выяснить, как изменяется лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия (ЛТА), образование агрегатов между лейкоцитами и эритроцитами (ЭЛА) и эритроцитами и тромбоцитами (ЭТА) у детей, больных инфекционным эндокар-

дитом

5. Установить, как влияет использование стандартной терапии изолированно и с применением тималина на состояние врожденного и приобретенного иммунитета, процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антирадикальную защиту, агрегационные функции лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов.

**Научная новизна.** Показано, что у детей с вторичным инфекционным эндокардитом снижается количество ТНК (CD3+CD16+CD56+) лимфоцитов. Одновременно уменьшается содержание Ig G и отмечается диссоциация в его подклассах (снижение IgG<sub>1</sub> и IgG<sub>2</sub> сопровождается увеличением IgG<sub>4</sub>).

Установлено, что у детей, больных ИЭ, имеется усиление способности лимфоцитов образовывать коагрегаты с тромбоцитами (ЛТА), а также увеличивается лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ). Кроме того, у больных ИЭ значительно возрастает число лейкоцитов, образующих агрегаты с эритроцитами (ЛЭА) и количество эритроцитов, способных присоединять тромбоциты (ЭТА).

Применение в комплексной терапии инфекционного эндокардита у детей тималина не только в большей степени нормализует показатели иммунитета, но и значительно улучшает клиническую эффективность лечения и отдаленные результаты.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные данные вносят вклад в понимание патогенеза инфекционного эндокардита. Для оценки состояния иммунологической реактивности больных инфекционным эндокардитом, наряду с исследованием клеточного и гуморального иммунитета рекомендуется определение ЛТА, ЛТИ, ЛЭА и ЭТА.

Для ликвидации нарушений в иммунитете и улучшения результатов терапии при инфекционном эндокардите у детей целесообразно применение тималина.

**Апробация основных положений работы.** Основные положения и результаты исследований доложены и обсуждены на научно-практической конференции "Здоровый ребенок" (Чита, 2007); Всероссийской научно-практической конференции "Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины" (Чита, 2008), посвященной 55-летию Читинской медицинской академии; на V Всероссийском конгрессе "Детская кардиология 2008"; на III Всероссийской конференции "Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии" в Москве (2009); на конференции, посвященной 55-летию Краевой детской клинической больницы (Чита, 2009); и неоднократных заседаниях педиатрического и физиологического общества г. Читы.

**Внедрение результатов исследования:** результаты работы внедрены в учебный процесс на кафедрах нормальной физиологии, патологической физиологии, госпитальной педиатрии ГОУ ВПО Читинской государственной медицинской академии, а также в лечебный процесс кардиоревматологического отделения Краевой детской клинической больницы № 1 г. Читы.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 работ, в т. ч. 1 статья в издании, определенном Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки РФ.

**Объём и структура работы.** Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы собственных исследований, обсуждение собственных данных, выводов, практических рекомендаций; иллюстрирована 31 таблицей, 4 рисунками. Указатель литературы включает 197 работ, из которых 152 отечественных и 45 зарубежных авторов.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. При вторичном инфекционном эндокардите у детей наблюдаются выраженные сдвиги в адаптивном иммунитете: уменьшается количество ТНК (CD3+CD16+CD56+), снижается уровень IgG за счет подклассов IgG<sub>1</sub> и IgG<sub>2</sub> и отмечаются разнонаправленные изменения концентрации про- и противовоспалительных цитокинов.
2. У детей, больных инфекционным эндокардитом, угнетение фагоцитарной активности лейкоцитов осуществляется на фоне дисбаланса системы ПОЛ-антиоксиданты. Одновременно у пациентов повышается лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия (ЛТА) и лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ), а также количество лейкоцитов, способных присоединять эритроциты (ЛЭА) и эритроцитов, взаимодействующих с тромбоцитами (ЭТА).
3. На фоне стандартной терапии инфекционного эндокардита повышается уровень ЦТЛ (CD8+) и В-лимфоцитов, снижается содержание активных Т-лимфоцитов (CD3+HLA-DR), увеличивается концентрация IgG и его подклассов IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>4</sub> и падает уровень IgA, IgM и IgG<sub>3</sub>, а также концентрация ИЛ-1β, но возрастает содержание ИНФγ.

Использование тималина приводит к повышению числа CD3+, CD4+, нормализует количество ТНК, ЛТА, ЛТИ и ЛЭА, усиливает фагоцитарную активность лейкоцитов, в большей степени увеличивает концентрацию иммуноглобулинов и улучшает клиническую эффективность терапии.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В процессе выполнения работы было обследовано 48 детей (28 мальчиков, 20 девочек) в возрасте от 6 до 14 лет (средний возраст 11,5 лет), с вторичным

инфекционным эндокардитом, находившихся на лечении в Краевой детской клинической больнице № 1 г. Читы за период с 2004 по 2009 годы. Нами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2000 ред.). Для диагностики заболевания использовались диагностические критерии, разработанные научно-исследовательской группой Duke Endocarditis Service Даремского университета (США) под руководством D. Durack (1994). Течение заболевания носило подострый характер и минимальную (I степень) степень активности. Клинические проявления заболевания отличались малосимптомностью, низким уровнем лабораторной активности и основным маркером данной патологии явились эхокардиографические признаки поражения эндокарда, положительная гемокультура выявлена в 8,3% случаев. Из исследования исключались дети, имеющие острое течение заболевания, а также II-III степень активности инфекционного процесса.

Все наблюдаемые пациенты с момента диагностики инфекционного эндокардита получали антибактериальную терапию препаратами широкого спектра действия, в основном из групп цефалоспоринов II-III поколения, "защищенных" аминопенициллинов, аминогликозидов парентеральным способом. Сроки терапии в среднем составили 4 недели.

Среди больных нами было выделено 20 пациентов, которые наряду с традиционной терапией получали лечение тималином в дозе 0,2 мг/кг в сутки, препарат вводился внутримышечно, курс терапии состоял из 10 инъекций.

Для иммунологических исследований были созданы репрезентативные выборки сопоставимые по полу, возрасту, клиническим проявлениям. Исследования проводили до начала терапии и после лечения.

В контрольную группу вошли 20 здоровых детей в возрасте от 6 до 14 лет, у которых при клиническом и лабораторном обследовании не было выявлено признаков соматической патологии.

**Исследование показателей периферической крови.** Показатели периферической крови исследовали на гематологическом анализаторе АВХ "Micros-60-OT8" (Франция).

**Определение лейкоцитарно-эритроцитарных и эритроцитарно-тромбоцитарных агрегатов.** Камерным методом, в мазках капиллярной крови, окрашенных по Романовскому-Гимза, подсчитывалось количество ауторозеток, образованных лейкоцитами и эритроцитами (ЛЭА), эритроцитами и тромбоцитами (ЭТА). За ЛЭА принимали клеточные ассоциации из 3 и более эритроцитов, тесно контактирующих с лейкоцитом, а также единичные эритроциты (1-2) с проявлениями экзоцитарного лизиса в контакте с лейкоцитом. Количество ауторозеток относили к 200 клеткам и высчитывали их относительное и

абсолютное число.

**Подсчет лейкоцитарных индексов интоксикации.** Подсчет ЛИИ осуществлялся по формуле, предложенной Т.П. Бондарь (2003):  $ЛИИ = \frac{GRA \cdot WBC}{(LYM + MON) \cdot 10}$ , где GRA - гранулоциты, WBC - общее количество лейкоцитов, LYM - лимфоциты, MON - моноциты.

**Исследование клеточного иммунитета.** Подсчет основных субпопуляций лимфоцитов произведен на проточном цитометре Erics XL-MCL фирмы Beckman Coulter (реактивы Immunotech, поставка компании "Биохиммакс") с выявлением поверхностных маркеров лейкоцитов CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+, CD45+, CD56+, HLA-DR+, CD4+/CB8+.

**Определение концентрации иммуноглобулинов.** Определение уровня Ig A, M, G, а также подклассов G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> проводили методом твердофазного ИФА с применением наборов реагентов ЗАО "Вектор-Бест" (г. Новосибирск).

**Определение уровня цитокинов.** Определение концентрации цитокинов в сыворотке крови (ИЛ-1β, ИЛ-8, ИЛ-4, ИНФγ) проводили методом твердофазного ИФА с применением наборов реагентов ЗАО "Вектор-Бест" (г. Новосибирск).

**Определение фагоцитарной активности нейтрофилов.** Определение базальной (без продигозана) и стимулированной (продигозаном) фагоцитарной активности нейтрофилов исследовали по их способности поглощать частицы латекса (Меньшиков В.В., 1987).

**Оценка лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА).** Определение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии проводили по методу, предложенному Ю.А. Витковским и др., (1999).

**Исследование перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в плазме и эритроцитах.** Определение общих липидов и концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) в плазме и эритроцитах проводили по методу Андреевой Л.И. и др. (1988). Величину общей антиокислительной активности плазмы крови определяли по методу М.И. Промыслова в модификации Б.И. Хышиктугева (1995). Уровень каталазы эритроцитов оценивали по методу М.А. Корнелюка и др. (1989).

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась при помощи электронной программы (Microsoft Office 2003 for Windows XP Professional). Различия между двумя средними значениями при нормальном распределении признака оценивали по критерию Стьюдента. При этом данные считали достоверными при  $p < 0,05$ . Результаты представлены как M (среднее значение) ± SD (стандартное отклонение).

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1. Состояние иммунитета, перекисного окисления липидов и лейкоцитарно-тромбоцитарно-эритроцитарных взаимоотношений у детей, больных вторичным инфекционным эндокардитом.

У пациентов, страдающих ИЭ, уровень гемоглобина, эритроцитов, количество тромбоцитов, и общее содержание лейкоцитов не отличалось от показателей контрольной группы. У всех больных по отношению к контролю отмечалось повышение числа сегментоядерных нейтрофилов ( $p < 0,03$ ;  $p < 0,02$ ) и снижение относительного количества лимфоцитов ( $p < 0,004$ ).

Степень выраженности эндогенной интоксикации отражают лейкоцитарные индексы интоксикации (ЛИИ), которые по современным представлениям свидетельствуют об остроте воспаления в организме. Оказалось, что ЛИИ больных ИЭ практически в два раза ( $p < 0,002$ ) выше аналогичных показателей здоровых детей, что свидетельствует о наличии у них легкой степени эндогенной интоксикации.

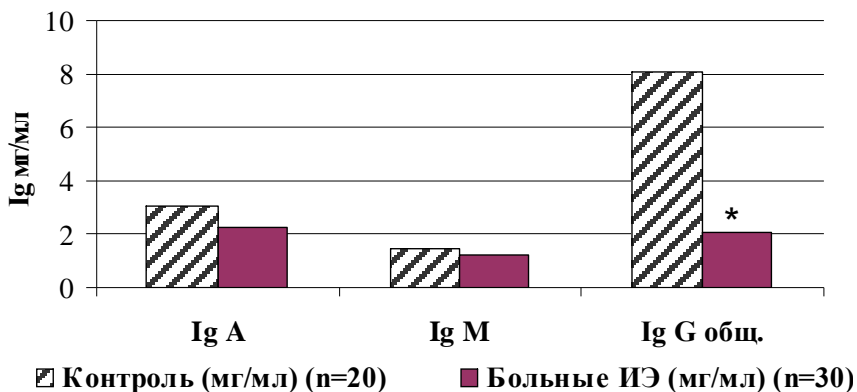
Нами установлено, что у больных ИЭ абсолютное число лейкоцитов и лимфоцитов до начала терапии оставалось в пределах нормы. Количество Т-лимфоцитов, несущих маркеры CD3+, а также активных Т-лимфоцитов (CD3+HLA-DR) до лечения не отличалось от контроля. Абсолютное содержание лимфоцитов CD4+ имело тенденцию к увеличению ( $p < 0,2$ ), тогда как число CD8+ и соотношение CD4+/CD8+ сохранялись в пределах нормы. Относительное и абсолютное содержание NK (CD3-CD16+CD56+) не превышали показателей здоровых детей, а количество TNK (CD3+CD16+CD56+) в начале лечения было сниженным в 2 раза ( $49,2 \pm 11$  при норме  $91,9 \pm 16$ ,  $p < 0,04$ ).

Представленные данные свидетельствуют о том, что у детей с проявлениями ИЭ снижено содержание TNK-клеток, одной из важнейших функций которых является регуляция соотношения Th1/ Th2 путем продукции ИНФ $\gamma$  и ИЛ-4, что влияет на адекватный ход иммунного ответа.

У больных ИЭ общее содержание В-лимфоцитов, а также концентрация IgA и IgM, не выходили за пределы нормы. Содержание общего IgG (рис. 1) у пациентов оказалось в сравнении с контролем резко сниженным (более чем в 4 раза). Выраженные изменения отмечались и в субклассах IgG - снижение концентрации IgG<sub>1</sub> и IgG<sub>2</sub> сопровождалось повышением уровня IgG<sub>4</sub> (рис. 2).

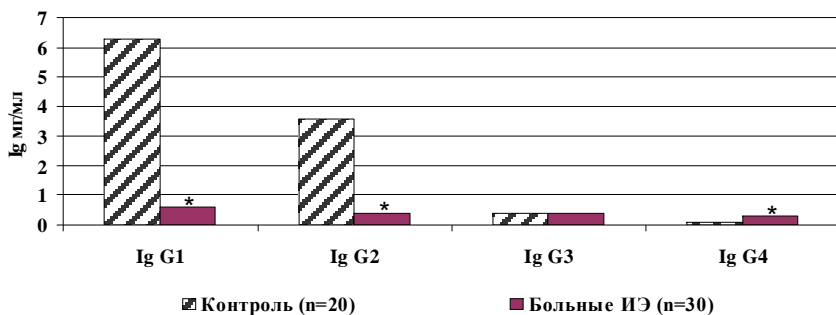
Полученные данные говорят о том, что, не смотря на нормальное содержание в крови В-лимфоцитов, их функциональная активность нарушена. Следовательно, у детей, больных ИЭ, проявляется недостаточность в гуморальном звене иммунитета.

Было обнаружено, что у детей с инфекционным эндокардитом исходный уровень ИЛ-1 $\beta$  и ИНФ $\gamma$  оказался сниженным ( $p < 0,03$ ;  $p < 0,001$ ). Концентрация



Примечание: \*- достоверность различий между больными и контрольной группой.

**Рис. 1.** Содержание иммуноглобулинов у детей, больных ИЭ (M±SD).



Примечание: \*- достоверность различий между больными и контрольной группой.

**Рис. 2.** Содержание субклассов Ig G у детей, больных ИЭ.

ИЛ-8, напротив, превышала норму более чем в 3 раза ( $p < 0,001$ ). Содержание противовоспалительного ИЛ-4 у больных в начале терапии по сравнению с нормой было низким ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, у детей, страдающих инфекционным эндокардитом, синтез цитокинов имеет свои особенности и свидетельствует о сдвигах в иммун-

ной системе.

Фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ) не отличались от таковых в контрольной группе (табл. 1). Вместе с тем, лейкоциты пациентов в меньшей степени отвечали на стимуляцию, чем лейкоциты здоровых детей и у них фагоцитарный индекс, и фагоцитарное число повышались незначительно после стимуляции продигиозаном (табл. 1).

Таблица 1

Состояние фагоцитарной активности лейкоцитов у детей, больных ИЭ  
(M±SD)

Показатель	Контроль (n=20)	Больные ИЭ (n=20)
Фагоцитарный индекс баз., %	39,4 ± 1,5	35 ± 2,1
Фагоцитарный индекс стим., %	43,9 ± 1,7	37,5 ± 2,4 p < 0,04
Фагоцитарное число баз.	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2
Фагоцитарное число стим.	3,5 ± 0,2	2,8 ± 0,2 p < 0,02

Примечание: p - статистически значимые различия между больными и контрольной группой

При ИЭ у детей выявлялась повышенная способность лимфоцитов образовывать коагрегаты с тромбоцитами. Так, показатель лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии возрастал до  $21,6 \pm 0,8 \%$  ( $p < 0,001$ ), в то время как у здоровых детей он составлял  $14,6 \pm 0,7 \%$  (табл. 2). Увеличение ЛТА свидетельствует о напряжении клеточного иммунитета, а уменьшение - о его угнетении или истощении (Витковский Ю.А. и др., 2005 - 2009; Кузник Б.И., 2005-2010). Как указывают наши данные, при ИЭ у детей имеется первая фаза этого процесса.

Следует отметить, что абсолютное число лимфоцитов, участвующих в адгезии у больных ИЭ, оказалось увеличенным почти в 2 раза (табл. 2).

Доказано, что клетками, взаимодействующими с кровяными пластинками, являются лимфоциты, несущие маркеры CD 3+, CD 4+, CD 16+, а индукторами взаимодействия являются ИЛ-2, ИЛ-1β, ИЛ-16, ингибиторами - ИЛ-4, ИЛ-10, ИНФγ (Витковский Ю.А. и др., 1999-2010; Kaplar M., et al., 2001; Li N., et al., 2006).

Кроме определения степени ЛТА, мы решили выяснить, какой процент ЛТА образуют Т-хелперы изолированно и совместно с НК и ТНК лимфоцитами.

Если представить, что ЛТА образуют только Т-хелперы, то в норме относительное содержание таких клеток соответствует  $36,8 \pm 2,3\%$ . Если же в число ЛТА-образующих клеток также включить НК и ТНК, то окажется, что эти цифры снижаются до  $27,2 \pm 1,6\%$ . При ИЭ процент лимфоцитов, образу-

Таблица 2

Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у детей, больных  
ИЭ (M ± SD)

Показатель	Контроль (n= 15)	Больные ИЭ (n= 30)
ЛТА %	14,6 ± 0,7	21,6 ± 0,8 p< 0,001
Лимфоциты %	42 ± 1,2	35,3 ± 1,4 p< 0,003
Лимфоциты, абс.	2517 ± 120	2417 ± 143
Число лимфоцитов, участвующих в адгезии, абс.	371,7 ± 26,8	528,7 ± 37,7 p< 0,008

Примечание: p - статистически значимые различия между больными и контрольной группой

щих ЛТА, значительно возрастает и достигает для Т-хелперов 47,8 ± 3,9% (p<0,03), а для Т-хелперов, NK и TNK - 38,6 ± 4,5% (p<0,03).

Не исключено, что повышение ЛТА при ИЭ носит компенсаторный характер при несостоятельности иммунокомпетентных клеток и направлено на иммунологическую защиту, осуществление местного гемостаза и репарации тканей.

В последнее годы активно изучаются межклеточные взаимодействия между лейкоцитами, эритроцитами и тромбоцитами, и их значение в патологических процессах, протекающих в организме.

При обследовании здоровых детей в капиллярной крови регистрировались единичные ЛЭА (лейкоцитарно-эритроцитарные агрегаты) - 5,3 ± 0,6 %. У детей, страдающих ИЭ, отмечалось резкое увеличение ЛЭА, число которых в среднем составляло 17,3 ± 1,6 % (p<0,001). Лейкоцитарно-эритроцитарные агрегаты представлены нейтрофилами и моноцитами. Преобладали агрегаты, образованные нейтрофилами - 77,4 ± 1,8 %, реже моноцитами - 21 ± 1,6 %. Количество агрегатов из тромбоцитов и эритроцитов (ЭТА) было несколько меньше - 16,3 ± 1,5 % (p < 0,001), при норме 5,0 ± 0,4 %. Появление ЛЭА и ЭТА сопровождалось деструкцией эритроцитов путем экзоцитарного лизиса, что обусловлено цитотоксическими свойствами контактирующих клеток. Интенсивность данного процесса более выражена при контакте с тромбоцитами.

Количество лейкоцитов, вступающих в адгезию с одним, двумя, тремя эритроцитами в среднем составляло 4,6 ± 0,8 %, в меньшей степени определялись агрегаты из четырех и более эритроцитов. Число одиночных тромбоцитов, присоединяющихся к эритроциту, оказалось больше, чем розеток из трех и более кровяных пластинок.

ЛЭА и ЭТА имеют значительные размеры и не способны проходить через капилляры, нарушая микроциркуляцию. При этом возрастает активность адгезивных молекул, что способствует застреванию лейкоцитов и образуемых ими агрегатов в капиллярах, венулах, артериолах, и, следовательно, усилению блокады микроциркуляторного русла.

Следует обратить особое внимание на то, что при контакте эритроцитов с лейкоцитами и тромбоцитами нередко у больных возникает экзоцитарный лизис. При этом из эритроцитов выделяются факторы коагуляции, что не может не отразиться на состоянии системы гемостаза.

У детей с поражением эндокарда выявлено усиление процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эритроцитах. Об этом свидетельствует увеличение продуктов, реагирующих с тиобарбитуратовой кислотой (ТБК-продуктов) (табл.3). В то же время антиоксидантная защита в эритроцитах снижена, о чём свидетельствует падение уровня каталазы. Несколько иная картина наблюдалась в плазме пациентов. Так, содержание ТБК-продуктов находилось в пределах нормы, а уровень общей антиокислительной активности (АОА) оказался повышенным (табл. 3).

Таблица 3

Перекисное окисление липидов и антиокислительная способность в плазме и эритроцитах у детей, больных ИЭ (M ± SD)

Показатель	Контроль (n= 20)	Больные ИЭ (n=20)
ТБК с, мкмоль/мг липидов	2,4 ± 0,20	2,01 ± 0,05
АОА сыворотки, %	11,4 ± 0,18	12,3 ± 0,15 p< 0,001
ТБК эр., мкмоль/мл	60,5 ± 1,24	68,9 ± 1,1 p< 0,001
Каталаза эр., нмоль/с* мг белка	13,75 ± 0,55	12,4 ± 0,14 p< 0,03

Примечание: p - статистически значимые различия между больными и контрольной группой

Таким образом, у детей с ИЭ отмечается активация процессов липопероксидации в эритроцитах, при этом нарушено равновесие в системе ПОЛ-антиоксиданты.

Все представленные нами в этой главе данные свидетельствуют о том, что у детей с вторичным ИЭ имеются отчетливые сдвиги во всех звеньях иммунной системы. У больных снижено содержание ТНК-лимфоцитов, наблюдаются выраженные нарушения в гуморальном иммунитете, страдает фагоцитарная активность лейкоцитов, активизированы межклеточные взаимодействия и процессы перекисного окисления липидов, что свидетельствует об иммунологической недостаточности больных и соответственно препятствует адекватной

элиминации микробных агентов из эндокарда пациентов. Поэтому, мы полагаем, что применение иммуномодуляторов в комплексном лечении больных с данной патологией является обоснованным и перспективным.

## **2. Влияние применяемой терапии на состояние иммунитета, перекисное окисление липидов и лейкоцитарно-тромбоцитарно-эритроцитарные взаимоотношения у детей, страдающих ИЭ.**

На фоне стандартного лечения, а также терапии с применением тималина, у больных ИЭ отмечалась нормализация уровня сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов. В группе пациентов, применявших тималин, в два раза возросло относительное и абсолютное количество моноцитов ( $p < 0,005$ ,  $p < 0,02$ ).

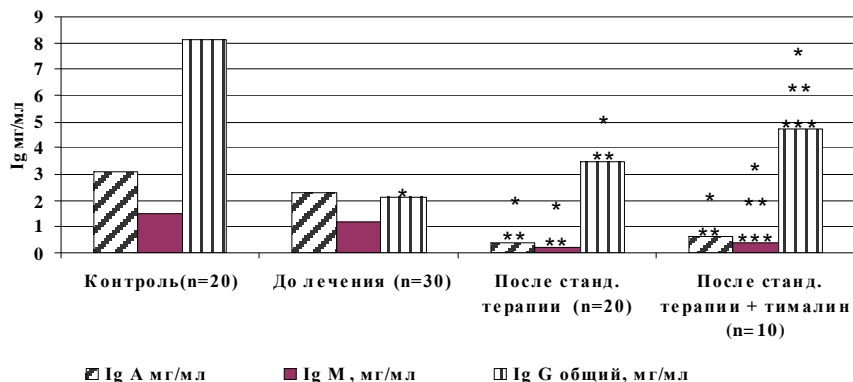
ЛИИ снизились в обеих группах больных до уровня здоровых детей, что свидетельствует об эффективности терапии и уменьшении эндогенной интоксикации в организме.

В процессе стандартной терапии имелась тенденция к увеличению абсолютного количества лимфоцитов ( $p < 0,1$ ), а также клеток, несущих маркеры CD3+ ( $p < 0,1$ ). При этом уровень активных Т-лимфоцитов оказался значительно сниженным ( $p < 0,02$ ), что, вероятно, связано с применением антибиотиков, угнетающих иммунитет. Абсолютное количество лимфоцитов CD8+ ( $p < 0,04$ ) повышалось и наблюдалась слабая тенденция к нарастанию числа CD4+ ( $p < 0,2$ ), тогда как соотношение CD4+/CD8+ не изменялось.

После использования тималина у пациентов повышалось содержание Т-лимфоцитов, несущих маркеры CD4+ ( $p < 0,02$ ), TNK ( $p^* < 0,05$ ) и активных Т-лимфоцитов ( $p^{**} < 0,005$ ), уровень цитотоксичных лимфоцитов (CD 8+) имел тенденцию к повышению ( $p < 0,09$ ), в то время как соотношение CD4+/CD8+ не изменялось.

Полученные данные свидетельствуют о том, что использование в комплексном лечении тималина в большей степени нормализует показатели клеточного иммунитета.

У больных ИЭ под влиянием стандартной терапии относительное и абсолютное число В-лимфоцитов возрастало и к концу лечения почти в 2 раза превышало норму ( $p < 0,04$ ,  $p < 0,02$ ). При использовании в комплексной терапии тималина содержание В-лимфоцитов практически не изменялось, оставаясь в пределах нормальных величин. Концентрация Ig A и Ig M у больных ИЭ, как при стандартной терапии, так и при использовании тималина, значительно снижалась, что может свидетельствовать об иммуносупрессивном влиянии антибиотиков (рис.3). Уровень IgG у пациентов в процессе лечения (особенно при использовании тималина) значительно увеличивался, хотя и не достигал показателей контрольной группы. Содержание IgG<sub>1</sub> не изменялось у детей,



Примечание: \* - достоверность различий между больными и контрольной группой; \*\* - достоверность различий между группами больных до и после лечения; \*\*\* - достоверность различий по отношению к стандартной терапии.

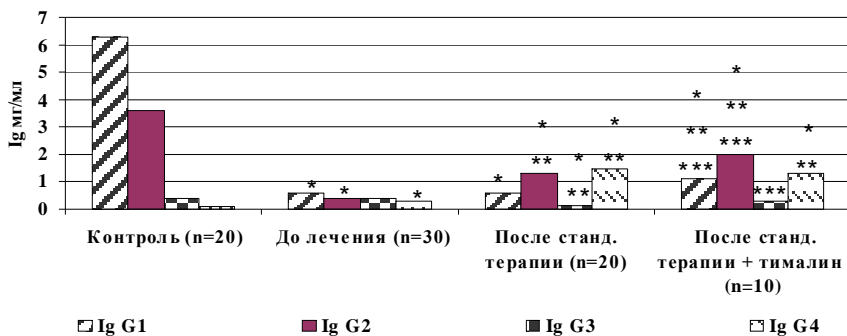
**Рис. 3.** Влияние используемой терапии на содержание иммуноглобулинов у детей, больных ИЭ (M±SD).

получавших стандартную терапию (рис.4). У больных пролеченных тималином этот показатель нарастал, но при этом не достигал уровня контроля. Концентрация IgG<sub>2</sub> при использовании тималина значительно увеличивалась и достигала нормы, что не наблюдалось у детей, находившихся на стандартном лечении. Уровень IgG<sub>3</sub> у больных в процессе традиционной терапии снижался в 2 раза, а у детей, применявших тималин, не изменялся. Концентрация IgG<sub>4</sub> в результате лечения повышалась в обеих группах более чем в 4 раза.

Таким образом, использование иммуномодулятора тималина в комплексном лечении больных ИЭ в большей степени устраняет функциональную неполноценность В-лимфоцитов и препятствует супрессорному влиянию антибиотиков, чем традиционная терапия.

Под влиянием терапии происходило изменение концентрации цитокинов у больных ИЭ. Как при стандартном лечении, так и с использованием тималина, уровень ИЛ-1β снижался в 4 раза (p < 0,001, p < 0,001).

Высокая концентрация ИЛ-8 нормализовалась после использования в комплексном лечении тималина, в то время как у детей, находившихся на стандартной схеме лечения, сохранялось повышенное содержание исследуемого хемокина (p < 0,03). Возрастание ИЛ-4 происходило в обеих группах, но в большей степени у пациентов, получавших тималин (p\* < 0,02, p\* < 0,001).



Примечание: \* - достоверность различий между больными и контрольной группой; \*\* - достоверность различий между группами больных до и после лечения; \*\*\* - достоверность по отношению к стандартной терапии.

**Рис. 4.** Влияние используемой терапии на содержание субклассов иммуноглобулинов у детей, больных ИЭ (M±SD).

Сниженные показатели ИНФу до лечения, после проведенной терапии возрасали в 3 раза в обеих группах ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,006$ ).

Таким образом, под влиянием терапии происходит затухание воспалительной реакции в организме и в большей степени это выражено при использовании тималина, о чем свидетельствуют снижение ИЛ-8, ИЛ-1 $\beta$  и нарастание ИЛ-4.

Проведенный анализ функциональной активности лейкоцитов на фоне лечения выявил следующие отклонения (табл. 4). После стандартной терапии у пациентов с ИЭ фагоцитарные показатели не изменялись. Применение тималина в комплексном лечении больных значительно повышало активность лейкоцитов: возрастал стимулированный ФИ и стимулированное ФЧ, что может быть связано с влиянием этого препарата на иммунологические процессы и некоторые метаболические параметры.

После терапии у больных детей происходило снижение способности лимфоцитов присоединять тромбоциты, благодаря чему уровень ЛТА восстанавливался до нормы. В большей степени это проявлялось у пациентов, получавших тималин. Уровень лимфоцитов, участвовавших в адгезии, после применения иммуномодулятора также снижался, а у пациентов, находившихся на стандартной терапии сохранялся на высоких значениях (табл. 5).

Повышенное число лимфоцитов, способных образовывать коагрегаты с тромбоцитами свидетельствует об адгезивной активности последних, а значит

Таблица 4

Влияние используемой терапии на фагоцитарную активность лейкоцитов у детей, больных ИЭ (M±SD)

Показатель	Контроль (n=20)	Больные ИЭ (n=20)			
		До лечения (n=10)	После станд. терапии (n=10)	До лечения (n=10)	После станд. терапии + тималин (n=10)
Фагоцитарный индекс баз., %	39,4 ± 1,5	34,8 ± 3,4	34,7 ± 2,2 p < 0,08	34,8 ± 2,3	37,4 ± 3,5
Фагоцитарный индекс стим., %	43,9 ± 1,7	37,1 ± 3,2 p < 0,05	36,8 ± 2,6 p < 0,03	37,4 ± 2,3 p < 0,03	45,0 ± 1,8 p * < 0,02 p ** < 0,04
Фагоцитарное число баз.	2,7 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,16	2,6 ± 0,2	3,0 ± 0,5
Фагоцитарное число стим.	3,5 ± 0,2	2,75 ± 0,3 p < 0,04	2,8 ± 0,18 p < 0,03	2,8 ± 0,2 p < 0,04	4,0 ± 0,5 p * < 0,04 p ** < 0,04

Примечание: p - статистически значимые различия между больными и контрольной группой; p\* - статистически значимые различия между группами больных до и после лечения; p\*\* - статистически значимые различия по отношению к стандартной терапии.

и сохранении сдвигов в иммунном статусе детей с ИЭ.

У пациентов, страдающих ИЭ, в процессе лечения снижалась интенсивность образования ЛЭА и ЭТА. У детей, которые находились на стандартной терапии, количество ЛЭА уменьшалось, но не достигало нормы (p < 0,001), при этом в агрегаты в основном входили одиночные эритроциты. У больных, в комплексную терапию которых был включен тималин, число ЛЭА восстанавливалось до нормы. ЭТА у детей с ИЭ снижались в обеих группах, но интенсивность образования агрегатов с кровяными пластинками оставалось на высоких цифрах (p < 0,001, p < 0,04). Число агрегатов с одиночными тромбоцитами было одинаковым в сравниваемых группах.

Таким образом, у больных ИЭ под воздействием терапии интенсивность ауторозеткообразования снижается. В большей степени этот процесс был отмечен у пациентов, получавших наряду с традиционной терапией тималин.

Стандартная терапия изолированно, так и с использованием тималина не изменяли в сыворотке уровень ТБК-продуктов и АОА (табл. 6). Положительные сдвиги в процессах ПОЛ и АР защиты отмечались лишь в эритроцитах больных

Таблица 5

Влияние используемой терапии на лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию у детей, больных ИЭ (M±SD)

Показатель	Контроль (n= 15)	Больные ИЭ (n=30)			
		До лечения (n=20)	После станд. терапии (n=20)	До лечения (n=10)	После станд. терапии + тималин (n=10)
ЛТА, %	14,6 ± 0,7	22,1 ± 1,1 p< 0,001	16 ± 0,7 p* < 0,001	23,1 ± 1,8 p< 0,001	13 ± 0,4 p* < 0,001 p** < 0,007
Лимфоциты, %	42,0 ± 1,2	36,4 ± 2,6	40,1 ± 2,1	37,6 ± 2,8	39,7 ± 3,2
Лимфоциты, абс.	2517 ± 120	2441 ± 137	2513 ± 122	2317 ± 154	2217 ± 163
Лимфоциты, участвующие в адгезии, абс.	371,7 ± 26,8	548,8 ± 40,3 p< 0,002	424,7 ± 32,8 p< 0,2	519,6 ± 39,2	278,7 ± 23 p< 0,02 p* < 0,001 p** < 0,06

Примечание: p - статистически значимые различия между больными и контрольной группой; p\* - статистически значимые различия между группами больных до и после лечения; p\*\* - статистически значимые различия по отношению к стандартной терапии.

после применения курса тимиалитерапии. У таких детей в эритроцитах снижалась активность окислительных процессов, сопровождающаяся повышением уровня каталазы. После стандартной терапии, наоборот, уровень ТБК-продуктов нарастал, при этом каталазная активность эритроцитов не изменялась.

Таким образом, в процессе применяемой стандартной терапии у детей, больных ИЭ, отмечалось лишь незначительное улучшение показателей клеточного иммунитета, тогда как при использовании тимиалина эти сдвиги носили более выраженный нормализующий характер. В процессе стандартного лечения уровень В-лимфоцитов увеличивался, но при этом сохранялась низкая концентрация всех классов иммуноглобулинов. Тимиалитерапия значительно улучшала или восстанавливала интенсивность синтеза отдельных классов иммуноглобулинов. Из провоспалительных цитокинов снижался уровень ИЛ-1β и незначительно увеличивался ИЛ-4, концентрация остальных цитокинов не имела существенных изменений. Стандартная терапия не привела к положительным сдвигам в фагоцитарной активности лейкоцитов и антиоксидантной защиты.

## Перекисное окисление липидов и антиокислительная способность в плазме и эритроцитах больных ИЭ (M ± SD)

Показатель	Контроль (n= 20)	Больные ИЭ (n=20)			
		До лечения (n=10)	После станд. терапии (n=10)	До лечения (n=10)	После станд. терапии + тималин (n=10)
ТБК с., мкмоль/мг липидов	2,4 ± 0,20	2,0 ± 0,08	2,1 ± 0,05	2,04 ± 0,07	2,06 ± 0,05
АОА с., %	11,4 ± 0,18	12,5 ± 0,18 p < 0,001	12,7 ± 0,4 p < 0,002	12,2 ± 0,17 p < 0,009	12,5 ± 0,2 p < 0,001
ТБК эр. мкмоль/мл	60,5 ± 1,24	68,7 ± 1,2 p < 0,001	75,7 ± 2,6 p < 0,001 p* < 0,02	69,1 ± 1,4 p < 0,001	66 ± 0,6 p < 0,005 p* < 0,07 p** < 0,03
Каталаза эр., нмоль/с* мг белка	13,8 ± 0,4	12,4 ± 0,18 p < 0,02	12,6 ± 0,15 p < 0,05	12,5 ± 0,15 p < 0,03	13,3 ± 0,3 p* < 0,03

Примечание: p - статистически значимые различия между больными и контрольной группой; p\* - статистически значимые различия между группами больных до и после лечения; p\*\* - статистически значимые различия по отношению к стандартной терапии.

При использовании тималина в комплексном лечении больных ИЭ нормализовалось соотношение про- и противовоспалительных цитокинов, активизировалась фагоцитарная активность лейкоцитов и антиоксидантная защита. Кроме этого, использование тималина в лечении больных нивелировало супрессивное влияние антибактериальной терапии на иммунитет.

Под влиянием терапии затухали воспалительные изменения в эндокарде, что проявлялось улучшением состояния больных, нормализацией лабораторных показателей и положительной динамикой со стороны ЭхоКГ. Более выраженная динамика отмечалась у больных, получавших тималин. В этой группе пациентов, в более ранние сроки, купировались проявления интоксикации, восстановились процессы реполяризации в миокарде и регрессировали клапанные изменения, что характеризовалось уменьшением размеров вегетаций, их более ранней организацией и происходило обратное развитие клапанной регургитации. Катамнестические данные (3-5 лет наблюдений) позволяют сделать заключение, что в группе детей, в комплексную терапию которых входил

тималин, не отмечено прогрессирование клапанных нарушений и рецидивов заболевания. У пациентов, находившихся на стандартной терапии, в 30% случаев обнаружено прогрессирование клапанных изменений, что потребовало повторных курсов антибактериальной терапии. Более того, двум пациентам из этой группы проведено протезирование аортального клапана в связи с нарастающей клапанной недостаточностью.

## ВЫВОДЫ

1. У детей, больных вторичным инфекционным эндокардитом, снижено относительное количество лимфоцитов и абсолютное число ТНК (CD3+, CD16+, CD56+), а также уменьшена концентрация IgG в том числе IgG<sub>1</sub> и IgG<sub>2</sub>, тогда как уровень IgG<sub>4</sub> повышен. Одновременно отмечается падение стимулированного фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа после активации продигозаном. У таких больных снижен уровень ИЛ-1β, ИНФγ и ИЛ-4, но увеличена концентрация ИЛ-8.
2. У больных инфекционным эндокардитом в эритроцитах усиливаются процессы перекисного окисления липидов и снижается содержание каталазы.
3. У детей, страдающих инфекционным эндокардитом, усилена лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия (ЛТА) и увеличен лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ), повышено количество лейкоцитов, способных присоединять эритроциты (ЛЭА), а также число тромбоцитов, взаимодействующих с эритроцитами (ТЭА).
4. На фоне стандартной терапии инфекционного эндокардита повышается абсолютное количество ЦТЛ (CD8+) и В-лимфоцитов, тогда как число активных Т-лимфоцитов (CD3+HLA-DR) значительно снижается. Одновременно при этом нарастает уровень общего IgG и его подклассов - IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>4</sub>, но падает концентрация IgA, IgM и IgG<sub>3</sub>. Под влиянием стандартной терапии нормализуется содержание ИНФγ и снижается уровень ИЛ-1β, тогда как фагоцитарная активность лейкоцитов и интенсивность процессов ПОЛ не изменяются.
5. Использование у больных инфекционным эндокардитом в сочетании со стандартной терапией тималина приводит к повышению числа Т-хелперов и активных Т-лимфоцитов, а также нормализует содержание ТНК клеток. Применение тималина сопровождается меньшим снижением концентрации иммуноглобулинов, чем при использовании только стандартной терапии. При этом усиливается стимулированная фагоцитарная активность лейкоцитов. Одновременно у таких больных усиливается антиоксидантная защита и нормализуются ЛТА, ЛТИ и ЛЭА.
6. Использование тималина у детей, больных инфекционным эндокардитом, приводит к быстрому достижению эффективности терапии. В более ранние

сроки исчезают проявления интоксикации, восстанавливаются процессы реполяризации в миокарде и регрессируют клапанные изменения. В катамнезе при использовании тималина не отмечено прогрессирования клапанных нарушений и рецидивов заболевания, тогда как у 30% больных, находившихся на стандартной терапии, эти изменения прогрессировали.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для оценки состояния иммунологической реактивности больных с минимальной степенью активности инфекционного эндокардита, наряду с исследованием клеточного и гуморального иммунитета, рекомендуется определение ЛТА, ЛТИ, ЛЭА и ЭТА.
2. Для ликвидации нарушений в иммунитете и улучшения результатов терапии при инфекционном эндокардите у детей целесообразно применять тималин в дозе 0,2 мг/кг в сутки внутримышечно, в течение 10 дней.

### **СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Долина А.Б. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у детей с вторичным инфекционным эндокардитом / А.Б. Долина // Забайкальский медицинский вестник. - 2004. - № 4. - С. 38.
2. Долина А.Б. Влияние тималина на лейкоцитарные индексы интоксикации у детей, страдающих инфекционным эндокардитом / А.Б. Долина // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины: материалы Всерос. научн.-практ. Конф. - Чита, 2008. - С.60-61
3. Кузник Б.И. Лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарные взаимоотношения у детей, страдающих инфекционным эндокардитом / Б.И. Кузник, А.Б. Долина, Т.М.Вишнякова // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2008. - № 3. - С. 31-38
4. Долина А.Б. Лейкоцитарно-эритроцитарно-тромбоцитарные взаимодействия у детей с заболеваниями сердечно-сосудистой системы // А.Б. Долина, О.Г. Максимова // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии: материалы III Всерос. конф. - М., 2009. - С. 149.
5. Долина А.Б. Влияние тималина на лимфоцитарно-тромбоцитарную адгезию у детей, страдающих инфекционным эндокардитом / А.Б. Долина // Дальневосточный медицинский журнал. - 2009. -№1. - С. 68-69
6. Долина А.Б. Влияние тималина на динамику цитокинов у детей с инфекционным эндокардитом / А.Б. Долина, Т.М. Вишнякова // Забайкальский медицинский вестник. - 2009. - №4. - С. 9-11.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОА	- антиокислительная активность
АР	- анитрадикальная (защита)
АФК	- активные формы кислорода
ВПС	- врожденные пороки сердца
ИЛ	- интерлейкины
ИЭ	- инфекционный эндокардит
ЛИИ	- лейкоцитарные индексы интоксикации
ЛТА	- лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия
ЛТИ	- лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс
ЛЭА	- лейкоцитарно-эритроцитарные агрегаты
ПОЛ	- перекисное окисление липидов
ТБК	- тиобарбитуратовая кислота
ФИ	- фагоцитарный индекс
ФЧ	- фагоцитарное число
ЭТА	- эритроцитарно-тромбоцитарные агрегаты
ЭхоКГ	- эхокардиография
ЭКГ	- электрокардиография
CD	- поверхностный лейкоцитарный антиген соответствующего дифференцировочного кластера
Ig	- иммуноглобулины
NK	- натуральные киллеры
TNK	- Т-зависимые натуральные киллеры
Th	- Т-хелперы

Лицензия ИД №03077 от 23.10.00.  
Подписано в печать 19.05.10. Бумага офсетная.  
Формат 60 x 84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Усл.печ.л-1,0 Тираж 100. Заказ № 842010.

Отпечатано в информационно-издательском центре ЧГМА  
672090, Чита, ул. Горького, 39а.