

На правах рукописи

БАХТИКЯН
Каринэ Карпетовна

**Этиотропная и патогенетическая терапия
неонатальных инфекций грибковой и
грибково-бактериальной этиологии**

14.00.09 - Педиатрия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2000

Работа выполнена в Российском государственном медицинском университете

Научные руководители:

Член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук,
профессор Н. Н. Володин;

кандидат медицинских наук, ассистент М. В. Дегтярева.

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор

В.М.Делягин;

действительный член МАН ВШ, доктор медицинских наук,

профессор Г. А. Самсыгина.

Ведущее учреждение: НИИ педиатрии и детской хирургии РАМН.

Защита диссертации состоится « ____ » 2000 года в _____

на заседании диссертационного совета д.084.64.01, в

НИИ детской гематологии МЗ РФ

(117513, Москва, Ленинский проспект, 117, корпус 1)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке

Российского государственного медицинского университета МЗ РФ

(117869, Москва, ул. Островитянова, 1).

Автореферат разослан «_» 2000 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук

С. Г. Осипов

Актуальность проблемы. Во многих развитых странах проблема микозов, вызванных условно-патогенными грибами рода *Candida*, становится все более значимой. Особенно возросла частота грибковых заболеваний среди новорожденных и детей первого года жизни (Самсыгина Г.А., 1996, Шабалов Н. П., 1995; Wright WL, 1997). Результаты 20-летнего микробиологического мониторинга у доношенных новорожденных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, поступавших в стационар из родильных домов Москвы, выполненного Самсыгиной Г. А. с соавт., выявили увеличение частоты кандидоза за этот период в 7 раз за счет кожного и кожно-слизистого кандидоза, кандидоза желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы.

Наиболее восприимчивыми к грибковой инфекции являются недоношенные новорожденные дети в силу онтогенетических особенностей иммунной системы (Винокурова С. М. 1997; Коваль Г. С.-, 1999; Ashman RB, 1998; Matthews RC.1998).

Кандидозы занимают большой удельный вес среди неонатальных госпитальных инфекций (Fridkin SK, 1996). Кандидоинфекция приобретает терапевтическую устойчивость и склонность к рецидивированию (Gregoу P., 1995; Franz R, 1998).

При поздней диагностике кандидоза противогрибковая терапия может оказаться малоэффективной (Шабалов Н. П., 1996). Вероятность неблагоприятного исхода заболевания у новорожденных с системными формами кандидоза возрастает при задержке назначения этиотропной терапии препаратами системного действия с каждым днем (Nucci M, 1998; Pacheco-Rios A, 1997).

Наряду с этиотропной терапией все возрастающее значение приобретают мероприятия по устранению факторов риска развития кандидоза, а также патогенетическая терапия, которая направлена на регуляцию иммунного ответа (Кетлинский С. А., 1992; Несмеянов В. А. 1998; KuUbergBJ, 1997).

Сложность диагностики и недостаточная осведомленность практических врачей в вопросах диагностики, лечения и профилактики неонатальных инфекций грибковой и грибково-бактериальной этиологии являются существенными причинами увеличения заболеваемости и смертности, а также развития окклюзионной гидроцефалии, приводящей к инвалидности детей.

Все вышеизложенное определило цель и задачи настоящего исследования.

Цель настоящей работы: оценить эффективность новых методов диагностики, этиотропной и патогенетической Терапии неонатальных инфекций грибковой и грибково-бактериальной этиологии.

Задачи исследования:

1. Определить роль неонатальных инфекций грибковой и грибово-бактериальной этиологии в структуре заболеваемости новорожденных различного гестационного возраста.
2. Сравнить эффективность различных методов диагностики (культурального и ПЦР) неонатальных инфекций грибковой этиологии.
3. Исследовать динамику сывороточных концентраций метаболитов грибов при неонатальных инфекциях грибковой этиологии.
4. Дать оценку динамики сывороточных концентраций провоспалительных (ИЯ-1β, ФНО-α, ИЛ-8) и противовоспалительных (ИЛ-4) цитокинов, а также состояния фагоцитарного звена иммунитета при неонатальных инфекциях грибковой и бактериальной этиологии.
5. Определить пути оптимизации этиотропной терапии неонатальных инфекций грибковой и грибово-бактериальной этиологии.
6. Оценить эффективность иммуномодулирующего препарата «Ликопид» при лечении затяжных инфекционных заболеваний у новорожденных детей и его роль в профилактике неонатального кандидоза.

Научная новизна.

Впервые проведена сравнительная оценка различных методов диагностики инфекций грибковой и грибово-бактериальной этиологии недоношенных новорожденных детей

Впервые определена роль метода ПЦР при диагностике кандидозов новорожденных детей.

Впервые доказано участие провоспалительных цитокинов (ИЛ-1β, ИЛ-8) в патогенезе неонатального системного кандидоза и возможность использования этих показателей в дифференциальной диагностике неонатальных инфекций грибковой и бактериальной этиологии.

Впервые установлено, что уровни сывороточной концентрации ИЛ-4 и ФНО-α не являются достоверными диагностическими критериями неонатального кандидоза мочевыводящей системы.

Впервые дана сравнительная оценка эффективности системных противогрибковых препаратов при лечении неонатального кандидоза

Впервые дана оценка эффективности иммуномодулирующего препарата «Ликопид» при лечении затяжных инфекционных заболеваний у новорожденных детей.

Практическая значимость.

Установлены важнейшие, конкретные факторы риска, наличие которых является прямым показанием для безотлагательного проведения обследования пациента на грибковую

инфекцию. Выделение группы риска по развитию кандидоза значительно снижает уровень заболеваемости и смертности от данной патологии.

Установлено, что ПЦР является эффективным методом диагностики кандидоза у новорожденных детей. Его применение наряду с культуральным методом значительно ускоряет постановку диагноза и обеспечивает своевременность и учет видовой специфичности при назначении системной противогрибковой терапии.

Установлено, что результаты определения абсолютных значений концентраций D-арабинитола в крови новорожденных детей на первой неделе жизни газохроматографическим методом недостаточно информативны при диагностике неонатального кандидоза мочевыводящей системы по сравнению с результатами других методов (культурального и ПЦР).

Результаты настоящей работы позволяют рекомендовать к использованию иммуномодулирующий препарат «*Ликопид*» в комплексной терапии тяжелых инфекционных заболеваний бактериальной и грибково-бактериальной этиологии, а также с целью профилактики неонатальных кандидозов.

Внедрение в практику/

Разработанные рекомендации применяются в отделении реанимации новорожденных Детского боксированного корпуса ГБ № 7 и отделении патологии новорожденных ДГКБ Хе 13 им П.Ф.Филатова. Материалы исследования используются в учебном процессе при подготовке врачей-курсантов на кафедрах неонатологии ФУВ РГМУ и РМАПО.

Апробация работы.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Московской городской школе-семинаре «Рациональная антибактериальная терапия» (23 декабря 1998 г.); на IV Международном конгрессе «Иммунореабилитация и реабилитация в медицине» (г. Сочи, 6 июля 1998 г.); на V Международном конгрессе «Иммунореабилитация и реабилитация в медицине» (Тенерифе, Канарские острова, 10 мая 1999 г.); на VI Международном конгрессе «Иммунореабилитация и реабилитация в медицине» (Эйлат, Израиль, 5 мая 2000 г.); на VII Всероссийском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 11 апреля 2000 г.) и совместной научно-практической конференции кафедры неонатологии ФУВ РГМУ, кафедры детских болезней №2 педиатрического факультета РГМУ, кафедры неонатологии РМАПО (г. Москва, 17 апреля 2000 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них 7 - статьи в центральных отечественных и международных медицинских журналах.

Объем и структура диссертации.

Диссертация написана на русском языке, на 135 страницах машинописи, состоит из 6 глав, выводов, практических рекомендаций и указателя литературы. Библиография включает 243 источника, в том числе 80 работ отечественных и 163 работы зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 9 диаграммами.

Содержание работы.

Работа выполнена на кафедре неонатологии ФУВ РГМУ (зав. кафедрой член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор Н. Н. Володин, ректор - академик РАМН В. Н. Ярыгин).

Основная Часть исследований проведена за период с сентября 1997 года по декабрь 1999 года.

Диссертационная работа выполнялась в 3 этапа.

I этап - с целью оценки частоты инфекций грибковой и грибково-бактериальной этиологии в структуре неонатальной заболеваемости, уточнения факторов риска развития, особенностей течения, ближайших и отдаленных последствий, а также выявления потенциальных возможностей оптимизации методов профилактики и лечения неонатальных кандидозов проведен ретроспективный анализ 1283 историй болезни новорожденных, находившихся на лечении в ДГКБ № 13 им. Н.Ф. Филатова (гл. врач - Г.И. Лукин) в период с 1995 по 1997 год. Выделены 3 группы:

1 группа - дети с кандидемией и грибковым менингитом (20 новорожденных)

2 группа - новорожденные с кандидозом желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей или мочевыделительной системы, а также сочетанным грибковым поражением слизистых оболочек (92 ребенка).

3 группа сравнения - новорожденные с инфекционными заболеваниями бактериальной этиологии, у которых не было выявлено кандидоза (30 детей).

II этап - с целью оценки различных методов диагностики кандидоза (культурального, ПЦР и газожидкостной хроматографии), а также изучения роли про- и противовоспалительных цитокинов в патогенезе кандидоза, исследовали венозную кровь 103-х, мочу -105-ти, аспират из трахеи - 73-х и ликвор - 13-ти новорожденных детей различного гестационного возраста в течение первого месяца жизни (последовательно в возрасте 5-7, 12-14 и 19-23 суток), которые находились на лечении в детском боксированном корпусе Городской больницы № 7 (главный врач - к.м.н. В.А. Афанасьев; зав. детским корпусом Г.Б. Фадеева). Выделены 2 группы

1 группа - новорожденные, у которых при посеве мочи обнаружен рост грибов рода *Candida* в количестве от 10^5 до 10^6 КОЕ/мл (12 детей).

2 группа - новорожденные дети, у которых при посеве крови, мочи и аспирата из трахеи грибов рода *Candida* не было обнаружено (19 детей).

III этап - с целью изучения клинической эффективности препарата Ликопид при бактериальных пневмониях и сопутствующей грибково - бактериальной инфекции мочевыводящей системы обследовали 48 детей, которые находились на лечении в отделении патологии новорожденных Детской Городской клинической больницы №13 имени Н.Ф.Филатова (гл врач - к.м.н. Г.И. Лукин, зав. отд. М.В. Кыштым) с помощью двойного слепого рандомизированного метода за период с сентября 1997 года по декабрь 1999 года. Детям основной группы назначали Ликопид в дозе по 0,5 мг (1/2 таблетки, растворенной в 2-3 мл воды) 2 раза в день за 20 минут до еды перорально (при необходимости - через зонд) или сублингвально в течение 7-10 дней. Выделены 2 группы:

1 группа (основная) - новорожденные с бактериальной пневмонией и сопутствующей грибковой и грибово-бактериальной инфекцией мочевыводящей системы, получавшие в составе комплексной терапии Ликопид (33 ребенка).

2 группа (контрольная) - новорожденные с бактериальной пневмонией и сопутствующей грибковой инфекцией мочевыводящей системы, которым проводилась только базисная терапия (15 детей).

Методы исследования.

Нами было проведено сопоставление особенностей анамнеза, клинической симптоматики и результатов лабораторного (общий анализ крови, мочи, биохимический анализ крови, общий анализ и микроскопия ликвора) и инструментального (нейросонография, Р-графия грудной клетки, электрокардиография, эхокардиография) обследования новорожденных детей, вошедших в исследование. Анамнестические характеристики всех обследованных групп новорожденных детей не имели достоверных различий и приведены в соответствующих главах диссертации.

Микробиологическое исследование крови, ликвора, мочи и эндотрахеального аспирата проводили по стандартной методике, согласно приказу № 535 МЗ СССР от 22 апреля 1985 года, в микробиологической лаборатории РМАПО. Степень кандадурии позволяет дифференцировать инфекционный процесс в мочевых путях от контаминации условно патогенными грибами рода *Candida*. С этой целью необходимо учитывать, что степень кандадурии при сборе мочи при помощи стерильного катетера, равная и выше 10^8 КОЕ/мл мочи, является диагностически значимой и свидетельствует о наличии инфекционного процесса грибковой этиологии.

С целью оптимизации методов диагностики неонатального кандидоза сервисной группой автоматического секвенирования ДНК Института Молекулярной Биологии им. В.А. Энгельгардта РАН был проведен анализ литературы и собственные исследования, позволившие

осуществить выбор системы олигонуклеотидных праймеров, максимально исключая диагностические ошибки по сравнению с культуральным методом, и модифицировать методику Makimura et al., 1994. Во всех случаях было проведено Параллельное исследование с применением ранее разработанной тест-системы диагностики *C. albicans*

Определение сывороточной концентрации D - арабинитола и маннозы методом газожижкостной хроматографии проводилось в хроматографической лаборатории ДГКБ № 13 согласно методическим рекомендациям, утвержденным Минздравом РФ «Диагностика грибковой инфекции методом газожижкостной хроматографии» № 96/1310 (1997).

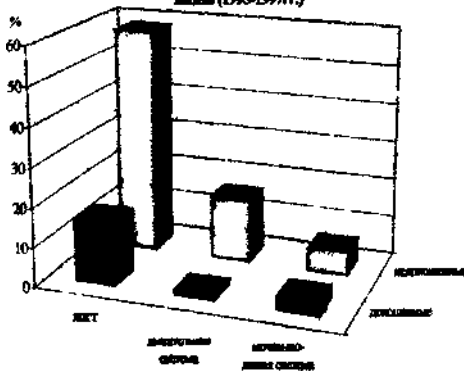
Для Количественного определения концентраций фактора некроза опухоли - альфа человека (ФНО-а), интерлейкина-1 β (ИЛ-1β), интерлейкина-4 (ИЛ-4) и интерлейкина-8 (ИЛ-8) в плазме крови в интервале концентраций 20-2000 пкг/мл. были использованы наборы реагентов (ООО «Цитокин», г. С.-Петербург, Россия).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась методом вариационной статистики. Изучался уровень достоверности различий цифровых параметров (по критерию Стьюдента), проводился корреляционный анализ. При математическом обчете результатов использовали пакет статистических программ Microsoft Excel 7.0.

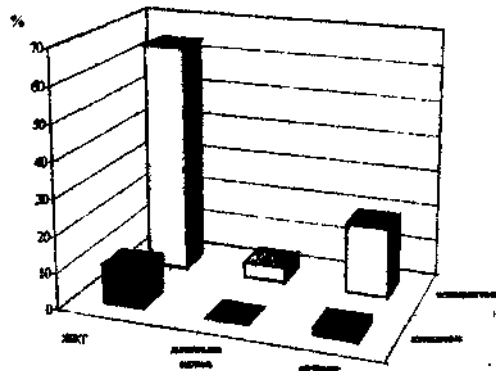
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

В ходе работы нами было выявлено, что в отделениях интенсивной терапии наиболее распространенной формой кандидоза, как до, так и после 14 суток жизни является кандидоз ЖКТ. После 14 суток жизни увеличивается частота грибкового поражения органов мочевыводящей системы (диагр.1,2)

Диагр. 1. Частота различных форм кандидоза новорожденных при выхаживании и выписывании и у недоношенных детей до 14 суток жизни (1995-1997гг.)



Диагр. 2. Частота различных форм кандидоза новорожденных при выхаживании у недоношенных и выписывании детей после 14 суток жизни (1995-1997гг.)



Важным является тот факт, что из года в год возрастает относительное число новорожденных детей с кандидемией и грибковым менингитом (от 3 до 13%). При этом в 95% случаев тяжелые формы кандидоза развиваются у недоношенных новорожденных детей (табл. 3). Таким образом, недоношенные новорожденные дети, нуждающиеся в проведении интенсивной терапии, составляют группу риска по развитию системных форм кандидоза.

Диagr. 3. Динамика частоты тяжелых форм (грибковый менингит, кандидемия) в структуре кандидозов в период 1995-1997 гг. у недоношенных и доношенных детей в НИЦ И ОПН.



Наше исследование также подтвердило мнение ряда авторов о том, что септические формы кандидоза в 25% случаев сопровождаются поражением ЦИС. Наиболее тяжелым проявлением генерализованной грибковой инфекции является грибковый менингит, который в 80% случаев приводит к развитию прогрессирующей гидроцефалии и детского церебрального паралича. За указанный период в 1 случае из 20 генерализованный кандидоз был непосредственной причиной смерти новорожденной девочки в возрасте 25 суток жизни. Нами выявлено, что наиболее важными факторами риска развития неонатального кандидоза являются количество антибактериальных препаратов, примененных при лечении новорожденных в первые 10 суток жизни, и продолжительность ШИИ более 6 суток (таб.1). Вопреки мнению ряда авторов, нам не удалось установить взаимосвязь между частотой кандидоза у новорожденных детей и наличием вагинального кандидоза у матери. В большинстве случаев неонатальный кандидоз имеет характер госпитальной инфекции и возникает на фоне антибактериальной терапии со 2 недели жизни. К генерализации грибковой инфекции в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных детей предрасполагает тяжелая перинатальная гипоксия (таб 2) Нами установлено наличие достоверно более низкой оценки по шкале Апгар на 1-ой минуте жизни у новорожденных, у которых впоследствии отмечалось развитие кандидемии и/или грибкового менингита, по сравнению с детьми с системными формами кандидозов и с детьми, страдающими инфекционными заболеваниями бактериальной

этиологии, не осложнившимися развитием кандидоза. По-видимому, тяжелая перинатальная гипоксия приводит к более серьезному нарушению механизмов защиты организма новорожденного и снижению иммунологического клиренса возбудителей (как бактерий, так и грибковой флоры). Клинически это проявляется более тяжелым течением бактериальных инфекций, требует большего количества и большей продолжительности курсов антибактериальной терапии, и сопровождается развитием у таких детей тяжелых форм кандидозов.

Табл. 1. Факторы риска развития неонатального кандидоза.

Табл. 2. Факторы риска генерализации неонатального кандидоза.

	Дега с локализованными формами кандидоза (n=92) M±ш	Группа сравнения (n=30) M±ш	ИГ р М BR	Дети с кандидемией И Ни грибковым ИЦ менингитом ■ (n=20) И M±ш	Дети с локализованными формами кандидоза (n=92) M±ш	р
Оценка по Апгар на 1 минуте(балл)	5,2±0,2	5,3±0,4	S 3,9±0,3		5,2±0,2	<0,05
Оценка по Апгар на 5 минуте (балл)	6,8±0,1	6,5±0,3	6Д±0,4		6,8±0,1	
Длительность ППП(сут)	10,9±0,8	5,9±1	<0,01	19,3±3,0	10,9±0,8	<0,05
Длительность ИТ (сут)	21,1±1,3	19,7±1,5		34,4±5,9	21,1±1,3	<0,05
Длительность ИВЛ (сут)	13,1±0,9	9,8±2,1		22,6±3,1	13,1±0,9	<0,05
Кол-во антибиотиков, примененных за первые 10 суток жизни	5,3±0,2	4,1±0,3	<0,05	7,9±0,8	5,3±0,2	<0,01

Клинические признаки генерализованной грибковой инфекции были практически неотличимы от таковых при бактериальном сепсисе. Развитие поздней неонатальной кандидемии и грибкового менингита происходило на 3-4 неделе жизни на фоне стабилизации состояния или разрешения основного заболевания (бактериальной пневмонии) В эти сроки у новорожденных наступало ухудшение состояния, проявляющееся развитием неврологической симптоматики, полиорганной недостаточности.

Наличие вышеперечисленных факторов риска и клинико-лабораторных признаков инфекционного заболевания, а также у детей с кандидемией наряду с нарастанием неврологической симптоматики - судорожного синдрома (генерализованных тонических или

тонино-клонических судорог), патологической глазной симптоматики, гипертензионно-гидроцефального синдрома, указывает на высокую вероятность развития грибкового менингита. Следует отметить, что только микроскопическое исследование спинномозговой жидкости является недостаточно информативным и не позволяет без проведения культурального исследования установить этиологический фактор.

Проведенный анализ показал, что в последние годы, в связи с улучшением методов диагностики и лечения грибковой инфекции, клинические проявления кандидоза мочевыделительной системы у новорожденных детей изменились и характеризуются наличием минимального мочевого синдрома, в то время, как в начале 90-х годов чаще встречались запущенные случаи данного заболевания вплоть до обструкции мочевыделительной системы скоплениями дрожжевых клеток и изменения плотности и состава мочи.

Из вышесказанного следует, что в последние годы клиническая картина системных и генерализованных форм неонатального кандидоза у недоношенных детей не имеет специфических клинических дифференциально-диагностических признаков.

Вместе с тем, результаты ретроспективного анализа свидетельствуют о том, что неонатальные кандидозы имеют тенденцию к генерализации. Несвоевременная диагностика системных кандидозов зачастую является причиной смерти либо инвалидизации детей. Вероятность неблагоприятного исхода заболевания у новорожденных с системными формами кандидоза возрастает, при задержке постановки диагноза, каждые 24 часа. В сложившихся условиях необходимо применять в отделениях реанимации новорожденных более оперативные методы диагностики кандидоза. Организация эффективного и оперативного микробиологического скрининга кандидоза и системы инфекционного контроля в отделениях реанимации и интенсивной терапии с целью незамедлительного назначения системной противогрибковой терапии и предотвращения распространения возбудителя послужит значительному снижению заболеваемости и смертности среди новорожденных детей.

Оценка анамнестических и клиничко-лабораторных данных новорожденных детей, у которых диагностика кандидоза проводилась при помощи тест-системы диагностики широкого спектра грибных патогенов, разработанной группой автоматического секвенирования ДНК, позволила сделать вывод, что метод ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров в данной модификации по результатам полностью сопоставим с культуральным и позволяет избежать гипердиагностики при обследовании мочи новорожденных детей, достоверно и оперативно выявлять грибковую инфекцию мочевыводящих путей на ранних стадиях.

Таб. 3. Сравнительная характеристика эффективности различных методов (культурального и ПЦР) диагностики кандидоза.

<i>Метод исследования</i>	БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ														
	КРОВЬ				МОЧА				Аспират из трахеи				ЛИКВОР		
	<i>Количество результатов</i>				<i>Количество результатов</i>				<i>Количество результатов</i>				<i>Количество результатов</i>		
	+		-		+		-		+		-		+	-	
Культуральный	1		315		12		310		0		85		0	13	
ПЦР	1		259		11		255		0		73		0	13	
Количество совпавших (да) и не совпавших (нет) результатов	<i>да</i>	<i>нет</i>	<i>да</i>	<i>нет</i>	<i>да</i>	<i>нет</i>	<i>да</i>	<i>нет</i>	<i>да</i>	<i>нет</i>	<i>да</i>	<i>нет</i>		<i>да</i>	<i>нет</i>
	1	0	259	9	11	1	255	0			73	9		13	9

Внутрибольничные штаммы *Candida* приобретают резистентность к различным противогрибковым препаратам. Видовая дифференциация грибных патогенов на кандидозные и не кандидозные, проводимая при помощи использованной нами дополнительной тест-системы методом ПЦР, позволяет более точно подобрать противогрибковый препарат. Нами доказана высокая информативность данной модификации метода ПЦР в отношении грибковой инфекции органов мочевыделительной системы. В связи с малым количеством случаев кандидемии и грибкового менингита в ходе проводимого нами исследования информативность метода при генерализованных формах кандидозов нуждается в дополнительном уточнении. При этом следует учитывать, что из всех проведенных исследований крови и ликвора методом ПЦР в параллели с посевами не было зарегистрировано ни одного ложноположительного результата.

Метод газожиждкостной хроматографии применяется для диагностики грибковой инфекции у детей грудного и старшего возраста. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что диагностика кандидоза мочевыводящих путей методом газожиждкостной хроматографии не позволяет получить объективную информацию о наличии данного заболевания. Результаты данного метода могут являться отражением других процессов: колонизации слизистых оболочек и/или особенностей метаболизма у новорожденных детей в раннем периоде адаптации.

Средние сывороточные концентрации D-арабинитола и маннозы у новорожденных детей в разгаре кандидоза мочевыводящей системы достоверно не повышались и не отличались от таковых у детей с пневмониями и/или перинатальным поражением ЦНС (таб. 4). Также не происходило достоверного снижения средних сывороточных концентраций D-арабинитола и маннозы у детей с кандидозом после проведения этиотропной терапии (таб. 5).

Таб.4. Сопоставление сывороточных концентраций метаболитов грибов у новорожденных детей основной и контрольной групп в возрасте 5-8 суток жизни.

Метаболиты (мкг/мл)	Название группы новорожденных						Р	Посевы мочи.						Р
	Основная			Контрольная				положительный			отрицательный			
	п	М	м	п	М	м		п	М	м	п	М	м	
D-арабинитол	7	0,67	0,17	19	1,14	0,14	<0,05	7	0,67	0,17	7	0,63	0,14	
Манноза	7	4,9	1,6	19	77,1	31,3	<0,05	7	4,86	1,6	7	12,5	7,17	

Таб. 5. Динамика сывороточных концентраций метаболитов грибов в результате этиотропной терапии.

Изучение иммунопатогенеза кандидозов у новорожденных детей позволит обосновать проведение рациональной иммунокоррекции, а также поможет выявить важные диагностические и прогностические критерии при различных формах данного заболевания.

Литературные данные об изменении сывороточных концентраций ФНО-а при системных кандидозах достаточно противоречивы. Нами было выявлено, что сывороточные концентрации ФНО- α у новорожденных детей 5-7 суток жизни с кандидозом мочевыводящей системы до назначения противогрибковой терапии достоверно не повышались по сравнению с показателями детей с пневмонией, а также достоверно не изменялись после проведения системной противогрибковой терапии.

- Согласно экспериментальным данным, макрофаги и, возможно, дендритные клетки способны поглощать грибы рода *Candida* даже в отсутствии опсонин и затем вырабатывать провоспалительные цитокины, такие как ИЛ-1 и ИЛ-6, макрофагальные воспалительные белки (MTP-1 (Macrophages Inflammatory Proteins-1) и MIP-2), и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор. В результате нашего исследования было выявлено, что у новорожденных детей с кандидозом мочевыводящей системы до назначения системной противогрибковой терапии имеется достоверное повышение сывороточных концентраций провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-8 (таб. 6). При проведении корреляционного анализа нами было выявлено Наличие на первой неделе жизни сильной прямой достоверной корреляционной связи сывороточной концентрации ИЛ-1 β и положительных результатов посева мочи на грибы ($r=0.96$; $p<0.001$), при отсутствии достоверной корреляции уровней ИЛ-1 β и ИЛ-8 с оценкой по шкале Апгар и с гестационным возрастом. Это подтверждает большую взаимосвязь данных провоспалительных цитокинов на 1 неделе жизни с инфекционным процессом, нежели с действием гипоксии или степенью зрелости ребенка. Сывороточные уровни провоспалительного цитокина ИЛ-4, способствующего активации Т-хелперов 2-го типа, достоверно не изменялись у детей с кандидозом органов мочевой системы по сравнению с

детьми с бактериальной инфекцией. Согласно экспериментальным данным, функциональная активность Т-хелперов 2 типа, ответственных за секрецию интерлейкинов-4, -6 -10, и дальнейший синтез специфических антител, влияет на развитие хронического кандидоза

Таб. 6. Сопоставление сывороточных концентраций ИЛ-1В, ИЛ-8, ИЛ-4 и ФНО-а у новорожденных детей с кандидозом МВС (основная группа) и без кандидоза (контрольная группа) в возрасте 5-7 суток жизни.

(пг/мл)	Название группы новорожденных детей						P-
	Основная			Контрольная			
	п	М	m	п	М	m	
ИЛ-1В	11	480	206,3	18	28,9	20,4	<0,05
ИЛ-8	11	ИЗО	419,9	18	153,3	69,2	<0,05
ИЛ-4	11	16,7	7,4	18	33,3	20,2	
ФНО-а	7	23,7	3,7	17	23,9	2,7	

Полученные результаты свидетельствуют! об участии провоспалительных цитокинов ИЛ-1В и ИЛ-8 в патогенезе неонатального кандидоза и их влиянии на исход заболевания, поскольку от уровней моноцитарных цитокинов зависит эффекторная функция лимфоцитов (цитотоксичность и выработка антител), нейтрофилов и макрофагов (фагоцитоз) по отношению к возбудителям инфекций и, в частности, к грибам рода *Candida* Наши результаты доказывают, что иммуноферментный метод определения сывороточных концентраций провоспалительных цитокинов может быть дополнительно отработан для эффективного применения с диагностической целью при кандидозах у новорожденных детей

В настоящее время существует проблема правильного, рационального выбора противогрибковых препаратов. Необходимо выработать дифференцированный подход при выборе антифунгального препарата для профилактики кандидоза у новорожденных детей. Наше исследование показало, что применение нистатина у детей в группе риска не предупреждает развития кандидоза. Наличие одновременно нескольких факторов риска развития кандидоза у детей старше 7-14 дней жизни, страдающих бактериальной инфекцией любой локализации, а также системные формы кандидоза требуют обязательного немедленного назначения противогрибковых препаратов системного действия.

Противогрибковое действие дифлюкана при лечении тяжелых форм кандидоза у недоношенных детей не является абсолютно эффективным. По своей эффективности при лечении неонатальных кандидозов флуконазол уступает фунгицидному амфотерицину В. Однако, амфотерицин В имеет больше побочных токсических эффектов и не может быть использован в терапевтических дозах в качестве монотерапии при кандидозах ЦНС, что объясняется слабой проходимостью его через гематоэнцефалический

барьер. Нами было показано, что в 18% случаев через 7-10 дней от начала терапии как дифлюканом, так и амфотерицином, посевы на грибы крови и/или ликвора могут оставаться положительными. По-видимому, продолжительность курса противогрибковой терапии определяется сроками санации крови и ликвора, обусловленными чувствительностью возбудителей к назначаемому антифунгальному препарату.

Обнаружение грибов рода *Candida* при посеве мочи новорожденного либо исследовании ее методом ПЦР требует немедленного, в течение ближайших 3 дней, назначения Дифлюкана в дозе 7-8 мг/кг/сут курсом на 7-8 дней при отсутствии диспептических явлений перорально или внутривенно капельно. Ни у одного ребенка с кандидозом мочевыводящей системы, выявленным на 1 неделе жизни и своевременно пролеченным по данной схеме, не наблюдалось рецидивов грибковой инфекции при наблюдении в катамнезе до 1 года жизни.

Дифлюкан эффективен при лечении кандидоза мочевыделительной системы у новорожденных на первой неделе жизни, при условии оперативной диагностики и своевременного назначения данного антимикотика. Назначение препарата Дифлюкан новорожденным детям с низкой и очень низкой массой при рождении в отделениях интенсивной герации с профилактической целью является эффективным, но, согласно большому количеству литературных данных, способствует культивации и внутрибольничному распространению высоко резистентных штаммов грибов рода *Candida*.

Важным резервом в профилактике и лечении инфекционных заболеваний у новорожденных детей является сочетание этиотропной терапии и рациональной иммунокоррекции, основанной на знании иммунопатогенеза заболевания

Осложнения грибковой и грибково-бактериальной этиологии возникают у новорожденных детей с затяжными бактериальными инфекциями, требующими сочетанной длительной антибактериальной терапии, а также различных инвазивных процедур. Изучение иммунопатогенеза бактериальных пневмоний было проведено с целью выявления тех его звеньев, которые способствуют ослаблению антимикотической защиты организма новорожденного ребенка.

При исследовании особенностей иммунной адаптации у здоровых и больных бактериальной пневмонией доношенных новорожденных на 5-7 сутки жизни было выявлено, что для детей с пневмонией характерны достоверное снижение уровня гемоглобина и эритроцитов, лейкопения (как нейтропения, так и лимфопения), изменение соотношения субпопуляций лимфоцитов (таб.7).

Таблица 7. Сравнение показателей гемограммы и фенотипа лимфоцитов у здоровых доношенных детей и доношенных новорожденных с бактериальной пневмонией на 5-7 сутки жизни.

Показатели.	Здоровые дети (n=22).	Дети с бактериальной пневмонией. (n=19).	P
Гемоглобин (г/л)	194,6 ±3,3	145 ±5,9	<0,01
Лейкоциты (10%)	13,7 ±0,9	7,3 ±0,3	<0,01
Палочкоядерные (%)	1,2 ±0,2	3,5 ±0,7	<0,05
Нейтрофилы (1 ОУл)	7,9 ±0,9	3,5 ±0,6	<0,01
Эозинофилы (10*/л)	0,36 ±0,08	0,13 ±0,04	<0,05
Моноциты (10%)	1,2 ±0,07	0,8 ±0,04	<0,05
Лимфоциты (10%)	4,3 ±0,3	2,9 ±0,3	<0,05
CD3 (%)	76,2 ±1,4	45 ±1	<0,05
CD3 (10%)	3,5 ±0,4	1,2 ±0,2	<0,05
CD4 (%)	58,2 ±2,5	34,5 ±11,5	<0,05
CD4 (10%)	2,7 ±0,3	0,8 ±0,1	<0,05
CD8 (%)	20,4 ±1,0	23 ±0	<0,05
CD8 (10%)	0,9 ±0,09	0,6 ±0,1	<0,05
CD4/CD8	2,9 ±0,2	1,5 ±0,5	<0,05
CD16 (%)	9,7 ±1,4	21,5 ±5,5	<0,05
ХЛ инд./ХЛ сп.	37,2 ±7,3	9,1 ±2,9	<0,05

Было выявлено, что у детей в разгаре бактериальной пневмонии на 5-7 сутки жизни плазменные уровни провоспалительных цитокинов IL-1β и TNF-α достоверно снижены по сравнению со здоровыми новорожденными. Уровни противовоспалительного цитокина IL-4 в Плазме у детей этих групп не различались.

Таблица 8. Сравнение Плазменных уровней цитокинов у здоровых доношенных детей и доношенных новорожденных с бактериальной пневмонией на 5-7 сутки жизни.

Показатели.	Здоровые дети (*22).	Дети с бактериальной пневмонией. (n=19).	P
IL-1β (пг/мл)	1169,4 ±176,2	653,2 ±157,2	<0,05
TNF-α (пг/мл)	408,9 ±62,3	236,3 ±48,9	<0,05
IL-4 (пг/мл)	61,1 ±11,2	148,4 ±142,1	

Установленные закономерности могут свидетельствовать о целесообразности включения в комплексную терапию неонатальных бактериальных и грибковых инфекций препаратов, усиливающих выработку эндогенных провоспалительных цитокинов

Одним из таких иммуномодуляторов является препарат "Ликопид". По своей структуре ЛИКОПИД является синтетическим аналогом основного фрагмента пептидогликана клеточной стенки всех известных бактерий (мурамилдипептида). Он сочетает отсутствие токсичности с

высокой иммуномодулирующей активностью. ЛИКОПИД был получен и подробно исследован в Институте Биоорганической Химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук.

ЛИКОПИД обладает способностью воздействовать практически на все основные популяции клеток иммунной системы (на макрофаги, Т- и В-лимфоциты), что, вероятно, связано с наличием у них специфических внутриклеточных рецепторов к глюкозаминилмурамилдипептиду (ГМДП). В организме здорового человека естественным источником ГМДП является нормальная микрофлора кишечника. Кроме того, мурамилдипептид был обнаружен в составе грудного молока.

Эффективность Ликопида оценивали по клиническим показателям (динамике состояния больного, скорости обратного развития клинических симптомов, длительности заболевания, частоте возникновения кандидозов на фоне антибактериальной терапии по поводу бактериальной инфекции). Учитывали сроки и степень нормализации показателей лабораторных и инструментальных методов исследования (общий и биохимический анализы крови, иммунный статус, скорость нормализаций микробиологических и рентгенологических данных).

Клиническая эффективность и безопасность применения Ликопида Было выявлено, что применение ЛИКОПИДА приводило к достоверно Значимому сокращению длительности пневмонии (по клинике-лабораторным данным и результатам рентгенографии грудной клетки) на 2-3 дня. На фоне терапии Ликопидом сокращалась продолжительность периода, в течение которого состояние больного ребенка расценивалось как тяжелое с $14,5 \pm 1,8$ до $1,6 \pm 0,9$ дней.

Не было выявлено достоверных различий по длительности пребывания в стационаре (по количеству койко-дней), вероятно, в связи с тем, **что** у Новорожденных детей различного гестационного возраста продолжительность госпитализации определяется не только наличием инфекционного заболевания, а также тяжестью перинатального поражения ЦИС и малой массой тела у недоношенных детей, что требует дополнительной коррекции в условиях стационара. Применение Ликопида у новорожденных детей не сопровождалось развитием побочных эффектов.

Ликопидом. В основной группе уменьшалось количество необходимых антибактериальных препаратов с $6,5 \pm 0,6$ до $5,1 \pm 0,5$ ($p < 0,05$); сокращалась длительность антибактериальной терапии по сравнению с контрольной.

За время пребывания в ОПН состояние ни одного ребенка из основной группы не потребовало проведения терапии кортикостероидными гормонами с целью лечения

надпочечниковой недостаточности при развитии септического шока, в то время как в контрольной группе у 8 детей развились витальные показания к проведению гормональной терапии гидрокортизоном или дексаметазоном в течение 4-13 дней.

В основной группе новорожденных детей реже возникали показания к проведению переливаний свежемороженой плазмы с заместительной целью и для дезинтоксикации: на одного ребенка контрольной группы, в среднем, количество трансфузий свежемороженой плазмы составляло $4,6 \pm 0,8$ раз, в основной группе - $3,2 \pm 0,7$ раз.

Было выявлено укорочение периода катетеризации центральных вен: в контрольной группе наличие подключичного катетера для проведения инфузионной терапии и парентерального питания было обязательным в течение $12,3 \pm 3,4$ дней, а в основной группе этот период укорачивался до $6,7 \pm 2,3$ дней ($p < 0,05$). На фоне включения Ликопада в комплексную терапию бактериальных пневмоний у детей без кандидозов из группы высокого риска, получающих антибактериальную терапию антибиотиками резерва, ни в одном случае не отмечалось развития грибковой инфекции как в ближайшем периоде, так и при наблюдении в катамнезе до 1 года жизни.

Влияние Ликопада на основные лабораторные показатели. У новорожденных детей основной группы в динамике отмечались купирование воспалительных изменений и нормализация формулы крови до возрастной нормы в более короткие сроки по сравнению с контрольной группой (таб.9).

Таблица 9. Изменение формулы крови у новорожденных детей различного гестационного возраста с затяжнВг течением инфекционных заболеваний на фоне лечения Ликопадом.

Показатели	До и после лечения Ликопадом		P
	До	После	
Лейкоциты (КГ/л)	$8,1 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,4$	
Палочкоядерные (%)	$6,9 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,9$	$< 0,05$
Сегментоядерные (%)	$43,6 \pm 2,8$	$28,7 \pm 6,1$	$< 0,05$
Нейтрофилы (10%)	$3,91 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,6$	$< 0,05$
Лимфоциты (%)	$37,4 \pm 2,3$	$55,5 \pm 5,9$	$< 0,05$
Лимфоциты ($10^9/л$)	$3,02 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,3$	$< 0,05$

Влияние Ликопада на основные иммунологические показатели. Применение ЛИКОПИДА в комплексной терапии инфекционных заболеваний бактериальной этиологии у новорожденных детей приводило к активации клеток моноцитарно-макрофагального ряда, что подтверждалось достоверным увеличением уровня спонтанной хемиллюминесценции по сравнению с контрольной группой (таб. 10). Как известно, активация макрофагов вызывает активацию, пролиферацию и дифференцировку основных субпопуляций лимфоцитов. В нашем исследовании было выявлено достоверное увеличение абсолютного и относительного

количества зрелых Т-лимфоцитов (CD3), нормализация иммунорегуляторного индекса (ИРИ = CD4 / CD8), достоверное увеличение сывороточного уровня IgM к концу курса лечения Ликолидом по сравнению с показателями иммунного статуса до начала терапии.

Таблица 10. Изменение иммунного Статуса у новорожденных детей различного гестационного возраста с затяжным течением инфекционных заболеваний на фоне лечения Ликолидом.

Показатели	До и после лечения Ликолидом		P
	До	После	
CD3 (%)	51,214,1	70,414,1	<0,05
CD3 (абс.)	1,510,2	2 [^] ±0,5	<0,001
CD4/CD8	1,810,1	2,810,2	<0,05
IgM (мг/мл)	63,415,9	86,416,8	<0,05
Хл. спонт.	5,412,1	14,111,8	<0,05
Хл. индуц.	83,9131,8	180,4164,8	
Хл.ивд/Хл.сп.	29,316,3	50,519,4	

Т. о., применение ЛИКОПИДА в составе комплексной терапии не только повышает эффективность лечения инфекционных заболеваний бактериальной этиологии у новорожденных детей, но и ограничивает влияние факторов риска и играет профилактическую роль по отношению к развитию нозокомиального кандидоза. После применения препарата Ликолид нормализуются основные иммунологические показатели.

Таким образом, включение в состав комплексной терапии затяжных инфекционных заболеваний у новорожденных детей препарата Ликолид уменьшает вероятность возникновения осложнений грибковой и грибково-бактериальной Этиологии

Выводы.

1. Из года в год возрастает частота выявления тяжелых форм нозокомиального неонатального кандидоза, наиболее распространенного у недоношенных новорожденных.
2. Наиболее значимыми факторами, способствующими переходу Candida-носительства в Candida-инфекцию, а также генерализации кандидоза, у новорожденных являются нерациональная антибактериальная терапия и длительность полного парентерального питания. К генерализации грибковой инфекции предрасполагает также тяжелая перинатальная гипоксия, приводящая к значительным нарушениям механизмов защиты организма новорожденного ребенка.
3. Клиническая картина системного и генерализованного кандидоза у недоношенных новорожденных детей не имеет патогномичных признаков, практически неотличима от бактериального сепсиса и развивается в большинстве случаев со 2 недели жизни. Септические формы кандидоза в 25% случаев сопровождаются поражением ЦНС.

4. Тест-система для диагностики широкого спектра грибковых патогенов, основанная на методе ПЦР, позволяет своевременно выявлять грибковую инфекцию мочевыводящих путей на ранних стадиях, осуществлять видовую дифференциацию грибов рода *Candida*, избегать гипердиагностики кандидоза при обследовании новорожденных детей
5. В патогенезе кандидоза важным является участие фагоцитарной системы иммунитета, о чем свидетельствует увеличение сывороточных концентраций провоспалительных цитокинов (ИЛ-1В и ИЛ-8) у новорожденных детей с грибковым поражением органов мочевыводящей системы.
6. Профилактическое применение нистатина у новорожденных детей из группы высокого риска по кандидозу не является эффективным.
7. Назначение препарата Ликопид в дозе по 0,5 мг (1/2 таблетки, растворенной в 2-3 мл воды) 2 раза в день за 20 минут до еды перорально (при необходимости - через зонд) или сублингвально в течение 7-10 дней новорожденным детям различного гестационного возраста с затяжным течением бактериальных инфекций улучшает основные клинические и иммунологические показатели, о чем свидетельствуют позитивные сдвиги в общем состоянии, нормализация формулы периферической крови и уменьшение вероятности возникновения осложнений грибковой этиологии.

Рекомендации для внедрения в практику.

1. С целью профилактики развития неонатальных кандидозов в отделениях интенсивной терапии и реанимации новорожденных детей необходимо осуществлять жесткий контроль за антибактериальной терапией и не допускать проведения длительного полного парентерального питания.
2. Для осуществления оперативного скрининга кандидоза мочевыводящей системы у новорожденных детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии необходимо использовать тест-систему диагностики широкого спектра грибковых патогенов методом ПЦР.
3. При наличии совокупности факторов высокого риска у новорожденных детей в возрасте 10-14 суток жизни в отделении реанимации и интенсивной терапии необходимо экстренное проведение обследования на наличие грибковой инфекции.
4. В случае обнаружения грибов рода *Candida* при посеве мочи недоношенных новорожденных либо исследовании ее методом ПЦР необходимо немедленное назначение Дифлюкана в дозе 7-8 мг/кг/сут курсом на 7-8 дней.
5. В комплексную терапию затяжных инфекционных заболеваний бактериальной и грибово-бактериальной этиологии у новорожденных детей различного гестационного возраста с

целью иммунокоррекции и профилактики возникновения и рецидивирования кандидоза показано включение Ликопада в дозе по 0,5 мг (1/2 таблетки, растворенной в 2-3 мл воды) 2 раза в день за 20 минут до еды перорально (при необходимости - через зонд) или сублингвально в течение 7-10 дней.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Актуальные вопросы перинатальной иммунологии // International Journal On Immunorehabilitation 6: 112-122, 1997 (соавт. Таболин В. А., Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Дегтярев Д.Н.)
2. Комплексный анализ показателей иммунитета у новорожденных детей при осложненном течении неонатального периода//В сборнике материалов IV Международного конгресса «Иммунореабилитация и реабилитация в медицине» 5-9 июля 1998 года, стр. 66, Сочи (соавт. Ковальчук Л.В., Галковская Л. В., Дегтярева М.З., Бедианидзе М.А., Долгина Е.Н., Никанкина Л.В.)
3. Особенности иммунореабилитации у новорожденных детей с ранними неонатальными' пневмониями //В сборнике материалов IV Международного конгресса «Иммунореабилитация и реабилитация в медицине» 5-9 июля 1998 года, стр. 37, Сочи 1998 (соавт. Володин Н.Н., Дегтярева М. В., Бедианидзе М. А., Долгина Е. Н., Ииканкина Л. В.)
4. Иммунокоррекция при бактериальных инфекциях у новорожденных детей: реальность и перспективы // International Journal On Immunorehabilitation 10: 174-182, 1998 (соавт. Таболин В. А., Володин Н.Н., Дегтярева М.В, Асмолова Г. А., Бедианидзе М. А.)
5. Заместительная иммунотерапия в лечении инфекционных заболеваний у новорожденных детей //В сборнике тезисов докладов научно-практической конференции «Современные проблемы перинатальной медицины» 10-12 марта 1998 года, стр.76-83, Сургут, 1998 (соавт. Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Бедианидзе М. А., Ковтун И. Ю.)
6. Особенности иммунологической адаптации у новорожденных в норме, при респираторном дистресс-синдроме и при пневмонии бактериальной этиологии//Леттабаоп! Journal On Immunorehabilitation 11- 82-91,1999 (соавт. Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Дегтярев Д. Н., Асмолова Г.А.,Ковальчук Л.В., Галковская Л.В., Долгина Е.Н., Никанкина Л.В., Бедианидзе М.А.)
7. Особенности кандидозов у новорожденных детей в условиях отделений реанимации и интенсивной терапии // Педиатрия им Г. Н. Сперанского 5: стр. 16-23,1999 (соавт. Володин Н. Н., Дегтярева М. В., Кыштымов М. В., Худолеева Е. Б., Кибченко С. Н.)

- 8 Иммуномодулятор "Ликопид". Опыт применения у новорожденных детей различного гестационного возраста с затяжным течением пневмонии // Ж. "Тerra Medica Nova", 1999, №3, стр.26-27 (соавт Н.Н. Володин, М.В. Дегтярева, А.В. Кривоножко)
9. Сравнительная характеристика информативности различных методов диагностики неонатальной кандидоза". // В сборнике материалов 6-ого Конгресса Педиатров России "Неотложные состояния у детей" 6-9 февраля 2000 года, стр. 55. Москва, 2000 (соавт. Асмолова Г.А., Дегтярева М.В., Володин Н.Н., Сидоренко С.В., Фадеева Г.Б., Щербо С.Н.)
- 10 Опыт применения иммуномодулятора "Ликопид" у новорожденных детей различного гестационного возраста с затяжным течением пневмонии **И** В сборнике материалов 3-ей региональной научно-практической конференции "Современные средства и технологии для лечения и иммунореабилитации в педиатрии", стр.27-33. Екатеринбург, 2000 (соавт. Володин Н.Н., Дегтярева М.В., Кривоножко А.В.)
- 11 ГЦР-диагностика микозов // В сборнике тезисов докладов (II-ей Всероссийской научно-практической конференции "Генодиагностика в медицине" 25-27 января 2000 года, стр.58-60, Москва, 2000 (соавт. Иванова Н. В., Полтараус А. Б., Сидоренко С. В., Серхова Г. В., Вылегжанина А. В., Васенова В. Ю., Бузина В., Щербо С.Н., Макаров В.Б.)
12. Особенности продукции цитокинов, субпопуляционного состава лимфоцитов и функционального состояния нейтрофилов при неонатальных пневмониях и способы иммунокоррекции // Медицинская иммунология Т.2(1) стр. 69-76, Спб., 2000 (соавт. Дегтярева М. В., Володин Н. Н., Солдатова И. Г., Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Кривцунова Л. Н.)
13. Роль про- и противовоспалительных цитокинов в иммунной адаптации новорожденных детей // International Journal On Immunorehabilitation Т.2 (1): стр. 175-185, апр., 2000 (соавт. Володин Н. Н., Дегтярева М. В., Симбирцев А. С., Котов А. Ю., Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Долгов В.В., Липагина А.А, Асмолова Г.А., Карачунская Е.М., Солдатова И.Г., Полякова О.В)

