

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА
ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ ІМЕНІ Л.В. ГРОМАШЕВСЬКОГО
НАМН УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

АНДРЮШКОВА НАТАЛЯ ГРИГОРІВНА

УДК 616.831-005-036.11-092:616-022.7:578.835.1

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЗНАЧЕННЯ ЕНТЕРОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У РОЗВИТКУ ГОСТРОГО
ПОРУШЕННЯ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ**

03.00.06 – вірусологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Н.Г. Андрюшкова

Науковий керівник:

Широбоков Володимир Павлович,
академік НАН та НАМН України,
доктор медичних наук, професор

АНОТАЦІЯ

Андрюшкова Н.Г. Значення ентеровірусної інфекції у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.06 “Вірусологія”. Дисертація виконана в Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця, Київ, 2019.

Дисертація захищається в ДУ “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України”, Київ, 2019.

Дисертація присвячена вивченню ролі ентеровірусної інфекції у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК).

На підставі вивчення та аналізу наукової літератури щодо сучасних поглядів на роль інфекції у етіопатогенезі ГПМК та встановленні значення ентеровірусів у виникненні та розвитку серцево-судинної патології показано, що ентеровіруси, які активно впливають на серцево-судинну систему, можуть бути активаторами патологічних процесів при різних формах ГПМК як однієї з форм серцево-судинної патології.

В ході дослідження було виділено ентеровіруси з сироваток крові хворих з ГПМК за допомогою класичного вірусологічного методу та ідентифіковано за допомогою реакції віруснейтралізації; проведено визначення генетичних маркерів виділених штамів вірусів з сироваток крові хворих з ГПМК; визначено присутність РНК ентеровірусів у сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); проведено порівняльний серологічний аналіз у хворих з ГПМК та осіб з групи порівняння на вміст специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) для визначення ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК.

За результатами власних досліджень було встановлено, що з сироваток крові хворих з ГПМК геноми ентеровірусів виділяються достовірно частіше,

ніж у пацієнтів групи порівняння ($23,6 \pm 5,9\%$ та $2,9 \pm 2,8\%$ відповідно, $p < 0,05$). Показано, що з 17 ПЛР-позитивних сироваток крові хворих основної групи у 11 випадках було виділено ентеровіруси, які були ідентифіковані у реакції віруснейтралізації як віруси Коксакі В (серотипи 2, 3, 4) та віруси ЕСНО (серотипи 6, 9, 27 (два штами), 29), три виділених штами вірусів не вдалося ідентифікувати. Отже, з виділених ентеровірусів віруси Коксакі В склали 27%, віруси ЕСНО – 46% та неідентифіковані ентеровіруси – 27%.

Встановлено, що досліджені ізоляти ентеровірусів характеризуються певними генетичними характеристиками: в усіх 11 ізолятів виявлено маркер gct_{40}^+ , у 10 з 11 ізолятів – бентонітовий маркер $A_{\text{бент}}^-$. Щодо маркеру S, вони диференціюються між собою: прояв маркеру S– мали 8 з 11 ізолятів.

Показано, що для штамів ентеровірусів, асоційованих з ГПМК, властиві наступні характеристики: здатність до репродукції при температурі $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (позитивний маркер gct_{40}^+), низький афінитет до бентоніту (маркер $A_{\text{бент}}^-$) та утворення дрібних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S–). Це дозволяє рекомендувати визначення генетичних маркерів для внутрішньотипової диференціації ентеровірусів, виділених з сироваток крові хворих з ГПМК.

На підставі результатів вірусологічного, молекулярно-генетичного та серологічного досліджень основну групу хворих з ГПМК було поділено на наступні підгрупи за наявними лабораторними маркерами ентеровірусної інфекції. Показано, що у 6 хворих за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виявлено ентеровіруси у сироватках крові та було виявлено специфічні Ig M, що є лабораторними маркерами гострої ентеровірусної інфекції. У 8 хворих за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виділено ентеровіруси у сироватках крові та в ІФА визначені лише Ig G до них або Ig M та Ig G, що є лабораторними маркерами хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення. У 9 хворих за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу не було виявлено ентеровірусів у сироватках крові, але виявлено Ig G в ІФА, що є лабораторними маркерами перенесеної

ентеровірусної інфекції. У сироватках крові 3 хворих було виявлено РНК ентеровірусів, але Ig M та Ig G до них виявлено не було, що свідчить про можливість персистоючої ентеровірусної інфекції. У 46 хворих з ГПМК не було виявлено лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції (серонегативні за Ig M та Ig G хворі).

Наявність у хворих основної групи лабораторних маркерів як гострої, так і хронічної персистоючої ентеровірусної інфекції, що доведено присутністю специфічних Ig M та/або Ig G, виділенням вірусів або їх геномів у сироватках крові цих хворих, свідчать про можливу тригерну роль як гострої, так і хронічної персистоючої ентеровірусної інфекції у розвитку ГПМК.

Встановлено, що середній вік хворих з лабораторними маркерами хронічної персистоючої ентеровірусної інфекції становив $53,9 \pm 7,7$ роки, тоді як у хворих без лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції – $63,8 \pm 10,5$ роки ($p < 0,05$). Показано, що тяжкість перебігу ГПМК у хворих з лабораторними маркерами, що свідчать про загострення хронічної ентеровірусної інфекції, при госпіталізації та через тиждень становила $5,6 \pm 1,7$ та $2,5 \pm 2,1$ балів за шкалою тяжкості інсульту Національного інституту здоров'я (National Institute of Health Stroke Scale, NIHSS) відповідно, що достовірно нижче, ніж у інших хворих основної групи ($p < 0,05$). Встановлено наявність гострої респіраторної вірусної інфекції в анамнезі за 1-14 днів до госпіталізації з приводу ГПМК у 41 хворого основної групи (56,9%), зокрема у 100% хворих з лабораторними маркерами хронічної персистоючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення та у 83,3% хворих з лабораторними маркерами гострої ентеровірусної інфекції. Виявлено сезонність виділення ентеровірусів від хворих з ГПМК з піками у квітні та жовтні-листопаді.

Отримані результати наукового дослідження довели, що ентеровірусна інфекція є важливим тригерним фактором у розвитку ГПМК. Для діагностики гострої та хронічної персистоючої ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК рекомендовано поєднання ПЛР для виявлення геномів ентеровірусів та виявлення специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів в ІФА. Застосування

класичного вірусологічного методу діагностики з вивченням генетичних маркерів дозволяє проводити внутрішньотипову диференціацію виділених штамів ентеровірусів.

Ключові слова: ентеровіруси, гостре порушення мозкового кровообігу, персистенція, генетичні маркери, вірусологічний метод, полімеразна ланцюгова реакція, імуноферментний аналіз.

SUMMARY

Andriushkova N.G. Role of enteroviral infection in development of acute cerebrovascular disease. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation for the scientific degree of the Candidate of Medical Sciences (Philosophy Doctor), in specialty 03.00.06 “Virology” (222 – “Medicines”). – Bogomolets National Medical University, Kyiv, 2019.

The dissertation is to be presented at the State Institution “The L.V. Gromashevsky Institute of the Epidemiology and Infectious Diseases of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv, 2019.

The dissertation is focused on research of the role of enteroviral infection in the development of acute cerebrovascular disease (ACVD).

The analysis of the scientific literature on the modern views on the infection role in the ACVD etiopathogenesis was carried out. The assessment of the enteroviruses impact on the emergence and development of the cardiovascular pathology was made as well. Therefore, it was proved that the enteroviruses having active impact on the cardiovascular system can be the activators of the pathologic processes with different forms of the ACVD as one of the cardiovascular disease forms.

As a part of this study, the enteroviruses were isolated from the blood sera of patients with the ACVD by the classic virology method and they were identified by the virology neutralization reaction. The detection of genetic markers of isolated viruses' stains of patients with the ACVD was carried out. The presence of

enteroviruses' RNA in the blood sera of patients with the ACVD was researched by the polymerase chain reaction (PCR). For the purposes of research of enteroviruses role in the ACVD development, the comparative serologic analysis was made by the enzyme immunoassay (EIA) for patients with the ACVD and for those of the comparative group with regard to content of Ig M and Ig G, which are specific to enteroviruses.

By own results it was established that the enteroviral genome was isolated reliably higher in the blood sera of patients with the ACVD of the main group than that of patients of the comparative group ($23.6\pm 5.9\%$ and $2.9\pm 2.8\%$ respectively, $p < 0,05$). It has been demonstrated that the enteroviruses were isolated in 11 from 17 PCR positive blood sera of patients of the main group. These enteroviruses were identified by the virology neutralization reaction as the Coxsackie-B viruses (serotypes 2, 3, 4) and the ECHO-viruses (serotypes 6, 9, 27 (two serotypes), 29), other three isolated serotypes were not identified. The Coxsackie B viruses composed 27%, the ECHO viruses – 46% and unidentified viruses – 27% of the isolated enteroviruses.

It was established that enteroviruses' isolates under research have specific genetic characteristics: the marker rct_{40}^+ was isolated in all 11 isolates, the bentonite marker A_{bent}^- was isolated in 10 from 11 isolates. Markers S differ among themselves: the S– marker emerged in 8 of 11 isolates.

It was shown that the viruses strains associated with the ACVD have following characteristics: the ability for reproduction at temperature of $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (positive marker rct_{40}^+), low affinity to bentonite (marker A_{bent}^-) and creation of small patches under the bentonite blanket (marker S–). This allows making a recommendation for determination of genetic markers for the intratypic differentiation of the enteroviruses isolated from the blood sera of patients with the ACVD.

The main group of patients with the ACVD was divided on the basis of virology, molecular-genetic and serologic methods to the following subgroups depending on the laboratory markers of enteroviral infection. It was shown that enteroviruses were isolated in blood sera and the specific Ig M (which are laboratory

markers of the acute enteroviral infection) were detected by the PCR and/or virology method in 6 patients. The enteroviruses were isolated in the blood sera by the PCR and/or virology method and only Ig G to them or Ig M and Ig G (which are the laboratory markers of the chronic persistent enteroviral infection in the exacerbation phase) were detected by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in 8 patients. No enteroviruses were isolated in blood sera by the PCR and/or virology method but Ig G (which are the laboratory markers of the enteroviral infection in past) were detected by the EIA in 9 patients. The enteroviruses' RNA were isolated in 3 patients, but no Ig M neither Ig G were detected and this can be assessed as presence of persistent enteroviral infection. The laboratory markers of enteroviral infection were not isolated in 46 patients with the ACVD (seronegative under Ig G and Ig M).

The presence of the laboratory markers of both acute enteroviral infection and chronic persistent enteroviral infection in patients of the main group, proven by presence of specific Ig M and/or Ig G, as well as the isolation of viruses or their genomes in blood sera of these patients indicate possible trigger role either of acute enteroviral infection or of chronic persistent enteroviral infection in the ACVD development.

It was shown that the average age of patients with laboratory markers of chronic persistent enteroviral infection was 53.9 ± 7.7 years while the average age of patients without such laboratory markers – 63.8 ± 10.5 years ($p < 0,05$). It was demonstrated that the complications during the ACVD passage in patients with laboratory markers, which proved the exacerbation of chronic enteroviral infection, composed $5,6 \pm 1,7$ and $2,5 \pm 2,1$ score on base of the National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) at the moment of hospital admission and in a week respectively which are reliably lower than in other patients of the main group ($p < 0,05$). It was proved that an acute respiratory viral infection (ARVI) in the anamnesis during 1-14 days until hospital admission for the ACVD reason was detected in 41 patients of the main group (56,9%), particularly in 100% of patients with laboratory markers of enteroviral infection in the exacerbation phase and in

83,3% of patients with laboratory markers of acute enteroviral infection. The seasonal fluctuation of the enteroviruses isolation from patients with the ACVD was found with the peaks in April and October-November.

The results of scientific research have proved that the enteroviral infection is an important trigger factor in the ACVD development. For the diagnosis of an acute and a chronic persistent enteroviral infections in patients with the ACVD it is recommended the combining of the PCR to detect the enteroviruses' genomes and the EIA to detect the Ig M and Ig G which are specific to enteroviruses. The usage of classic virology method of diagnostics with the research of the genetic markers allows to carry out the intratypic differentiation of isolated enteroviruses serotypes.

Key words: enteroviruses, acute cerebrovascular disease, persistence, genetic markers, virology method, polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(* – особистий внесок здобувача)

У періодичних зарубіжних фахових виданнях:

1. The role of the persistent enterovirus infection in development of acute stroke / N.G. Andriushkova et al. // Wiadomosci Lekarskie. 2017. T. LXX, № 2. P. 187—191 (* накопичення та обробка матеріалів, проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).
2. Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С., Долинчук Л.В. Роль энтеровирусной инфекции в возникновении острого нарушения мозгового кровообращения // Современные исследования медико-биологических наук. Москва, 2014. С. 35—40 (* накопичення та обробка матеріалів, аналіз результатів).

У періодичних фахових виданнях, затверджених МОН України:

3. Андрюшкова Н.Г. Возможный етіопатогенетичний зв'язок між Коксаки В вірусною інфекцією та гострим порушенням мозкового кровообігу // Актуальные проблемы медицины и биологии. 2007. № 1. С. 88—97.
4. Андрюшкова Н.Г. Роль ентеровірусів в серцево-судинній патології // Медична наука України. 2015. Т. 11, № 1—2. С. 105—109.
5. Дослідження генома ентеровірусів у сироватці крові хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Український неврологічний журнал. 2016. № 3. С. 8—12 (*накопичення та обробка матеріалів, проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).
6. Геном ентеровірусів у сироватці крові хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медичні перспективи. 2016. Т. XXI, № 4. С. 33—38 (*накопичення та обробка матеріалів, проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).

7. Персистуюча ентеровірусна інфекція у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медична наука України. 2016. № 4. С. 41—51 (*накопичення та обробка матеріалів, проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).
8. Кореляція між ентеровірусною інфекцією та гострим порушенням мозкового кровообігу на підставі вірусологічного, молекулярно-генетичного та серологічного методів дослідження / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медична наука України. 2017. № 3—4. С. 38—45 (* накопичення та обробка матеріалів, проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).

Патент:

9. Пат. 93020 UA. МПК А61В 5/00 (2014.01) Спосіб діагностики ентеровірусної інфекції у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Н.С. Турчина, Н.Г. Андрюшкова; заявник та патентовласник Національний медичний університет імені О.О. Богомольця. — № u 2014 04634; заявл. 30.04.2014 ; опубл. 10.09.2014, Бюл. № 17 (*накопичення та обробка матеріалів, аналіз результатів).

Опубліковані праці апробаційного характеру:

10. Андрюшкова Н.Г. Ентеровірусна інфекція як імовірна причина гострого порушення мозкового кровообігу // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції “Роль та місце медицини у забезпеченні здоров’я людини у сучасному суспільстві”, 27 грудня 2013 року. Одеса, 2013. С. 161—163.
11. Энтеровирусная инфекция, как возможный фактор риска развития острого нарушения мозгового кровообращения / Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С., Унич П.П., Трепет Л.Н. // Матеріали XIV міжнародної наукової конференції “Формування національних і загальнолюдських цінностей у студентів медичних і фармацевтичних вищих навчальних закладів”, 26 березня 2014 року. Київ, 2014. С. 18—22 (*накопичення та обробка

матеріалів, проведення вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень, аналіз результатів).

12. Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С. Застосування полімеразно-ланцюгової реакції для визначення етіологічної ролі ентеровірусної інфекції у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу // Матеріали VI Конгресу Південно-Східно Європейського Медичного Форуму та XIV з'їзду Всеукраїнського лікарського товариства, 8-15 вересня 2015 р. Одеса, 2015. С. 336 (*накопичення та обробка матеріалів, проведення молекулярно-генетичного методу дослідження, аналіз результатів).

ЗМІСТ

	стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	14
ВСТУП	15
РОЗДІЛ 1. РОЛЬ ЕНТЕРОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У РОЗВИТКУ ГОСТРОГО ПРОРУШЕННЯ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	23
1.1. Сучасні погляди на роль інфекції у етіопатогенезі гострого порушення мозкового кровообігу.....	23
1.2. Значення ентеровірусів у виникненні та розвитку серцево- судинної патології.....	36
РОЗДІЛ 2. ПРОГРАМА, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ....	51
2.1. Клінічна характеристика обстежених хворих.....	52
2.2. Матеріали і методи дослідження.....	54
2.2.1. Вірусологічні методи.....	54
2.2.2. Молекулярно-генетичний метод (полімеразна ланцюгова реакція).....	60
2.2.3. Серологічний метод діагностики (імуноферментний аналіз)	61
2.2.4. Статистичний аналіз.....	63
РОЗДІЛ 3. ВИКОРИСТАННЯ ВІРУСОЛОГІЧНОГО, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ТА СЕРОЛОГІЧНОГО МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ СИРОВАТОК КРОВІ ХВОРИХ НА ГОСТРЕ ПОРУШЕННЯ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ З МЕТОЮ ВИЯВЛЕННЯ ЕНТЕРОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ.....	67
3.1. Використання молекулярно-генетичного методу для виділення геному ентеровірусів у сироватках крові хворих на гостре порушення мозкового кровообігу.....	67
3.2. Використання вірусологічного методу для виділення та ідентифікації ентеровірусів з сироваток крові хворих на гостре порушення мозкового кровообігу.....	69
3.3. Серологічна ідентифікація виділених цитопатичних агентів за допомогою реакції віруснейтралізації на культурі клітин.....	73
3.4. Характеристика фенотипових властивостей виділених штамів	

вірусів шляхом визначення генетичних маркерів вірулентності.....	76
3.5. Визначення специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів у сироватках крові хворих на гостре порушення мозкового кровообігу за допомогою імуноферментного аналізу.....	81
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ КЛІНІКО-ЛАБОРАТОРНИХ ДАНИХ ХВОРИХ З ГОСТРИМ ПОРУШЕННЯМ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ ТА ЛАБОРАТОРНИМИ МАРКЕРАМИ ЕНТЕРОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ	95
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	106
ВИСНОВКИ.....	123
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	126
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	127

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АС	–	атеросклероз
ВООЗ	–	Всесвітня організація охорони здоров'я
ГПМК	–	гостре порушення мозкового кровообігу
ЗТ-ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція у варіанті зворотньої транскрипції
ІМ	–	інфаркт мозку
ІФА	–	імуноферментний аналіз
кДНК	–	комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота
ЛПНЩ	–	ліпопротеїни низької щільності
м-ЛПНЩ	–	модифіковані ліпопротеїни низької щільності
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
РНК	–	рибонуклеїнова кислота
ТІА	–	транзиторна ішемічна атака
ТЦД ₅₀	–	доза, що викликає цитопатичну дію у 50% тест-культур клітин
ФР	–	фактори ризику
ЦПД	–	цитопатична дія вірусу
CMV	–	Citomegalovirus
Ig	–	immunoglobulin
ЕCHO	–	Enteric Cytopathogenic Human Orphans viruses
EBV	–	Epstein-Barr virus
HeLa	–	клітини карциноми шийки матки людини
HEp-2	–	клітини – похідні епідермальної карциноми людини
HSV1	–	Herpes simplex virus 1
HSV2	–	Herpes simplex virus 2
RD	–	клітини рабдоміосаркоми людини
VZV	–	Varicella zoster virus

ВСТУП

Актуальність теми.

На даний час у розвитку інфекційної патології людини все більшого значення набувають ентеровіруси. Науковий інтерес до них зумовлений низкою причин: кількість виділених видів ентеровірусів щорічно збільшується, розширюється спектр захворювань, виникнення яких пов'язують з цією інфекцією, завдяки використанню сучасних методів

діагностики [84, 120, 140]. Ряд авторів (Амосова К.М., 1996; Анохін В.А. та ін., 2014; Бондаренко В.І. та ін., 2008; Бондаренко А.Л. зі співавт., 2012; Гиріна О.Н., 1996; Журба Т.Б., 1985; Задорожна В.І., 2012; Кротенко О.В., 2001; Плоткин В.Я. зі співавт., 2013, 2015, 2016; Широбоков В.П. та ін., 1998, 1999; Яговкін Е.А. зі співавт., 2016; Caserta T., 2013; Imed G. et al., 2012) вказують на патогенетичну роль ентеровірусів при інфаркті міокарду, міокардиті, перикардиті, дилатаційній кардіоміопатії, атеросклерозі, гострому коронарному синдромі, в патології нирок, розвитку апендициту, при гепатиті, панкреатиті, юнацькому діабеті, дерматомікозах, псоріазі [4, 26, 35, 39, 41, 57, 66, 97, 105, 120, 132, 137, 138, 139, 163, 277].

Встановлення ролі ентеровірусних інфекцій у розвитку судинної патології головного мозку є актуальним на сьогодні. Ці захворювання складають від 30% до 50% хвороб серцево-судинної системи [78, 104]. В їх структурі провідне місце належить гострим порушенням мозкового кровообігу (ГПМК). За даними ВООЗ, у світі щорічно реєструється 15 млн випадків інсультів, а смертність від інсультів складає 12-15% загальної смертності, посідаючи третє місце після захворювань серця і злоякісних пухлин [22, 29, 118, 175]. В Україні перше місце серед причин смертності населення припадає на серцево-судинні захворювання, питома вага яких у 2013 р. склала 66,5 %. За прогнозами ВООЗ на 2020 рік, ішемічна хвороба серця та цереброваскулярні хвороби увійдуть до десяти основних причин тягара хвороб у країнах з ринковою економікою та колишніх соціалістичних країнах, складаючи, відповідно, 11,2% та 6,2% від загального тягара хвороб [27, 133, 148].

На даний час вважається, що інфекційні та запальні процеси є факторами ризику розвитку інсульту (Жусупова А.С., 2017; Манахаев Б.К., 2016; Chen L. et al., 2018; Urbanek S. et al., 2010) [40, 73, 181, 285]. Вперше було висловлено припущення про зв'язок коронарного склерозу курчат з інфекційним агентом, який пізніше віднесли до родини Herpesviridae, у 1950 році, і лише майже тридцять років потому досліди з інфекційного моделювання атеросклерозу

були відтворені Fabricant із співавторами (Fabricant C.G. et al., 1978, 1983) [54, 217, 287]. Розглядається можлива причетність вірусів простого герпесу 1 та 2 типів (Herpes simplex virus 1 (HSV1) та Herpes simplex virus 2 (HSV2)), вірусу вітряної віспи (Varicella zoster virus, VZV), цитомегаловірусу (Citomegalovirus, CMV), Епштейн-Барр вірусу (Epstein-Barr virus, EBV) (Breuer J. et al., 2014; Galassi G. et al., 2018; Snider S.B. et al., 2014), аденовірусів (Kutleza M. et al., 2009), вірусів грипу (Sessa R. et al., 2014), ентеровірусів (Kis Z. et al., 2007), Chlamidia pneumoniae (Tumurkhuu G. et al., 2018) та їх асоціацій (Voorend M. et al., 2008; Fugata J.E. et al., 2014) у розвитку ГПМК [167, 169, 172, 214, 215, 230, 232, 237, 288].

Вперше гіпотезу про роль вірусів в патогенезі судинного захворювання підтверджено шляхом виявлення антигенів вірусу Коксакі В в атеросклеротично зміненій аорті (Burch G.E. et al., 1973) [160]. Розширення вірусологічних досліджень засвідчило, що більшість випадків неревматичного захворювання серця обумовлені ентеровірусами (Амосова К.М., 1996; Кротенко О.В., 2001; Палєєв Ф.Н., 2016; Ширококов В.П. та ін., 1999; Andreoletti L. et al., 2007; Li L. et al., 2018; Tan G. et al., 2018) [4, 50, 66, 127, 132, 178, 184, 260]. Сучасні вірусологічні дослідження доводять інтенсивну циркуляцію ентеровірусів в різноманітних об'єктах навколишнього середовища (Доан С.І. та ін., 2018; Caserta T., 2013; Wiyatno A. et al., 2016; Rogka V. et al., 2017) [33, 163, 188, 240]. Не з'ясованими залишаються особливості циркуляції різноманітних серотипів ентеровірусів, механізмів змін домінуючих в циркуляції серотипів ентеровірусів та причин виникнення епідемічних спалахів (Задорожна В.І., 2012, 2015; Battistone A. et al., 2014) [41, 42, 275]. Майже не висвітлено питання про етіопатогенетичну роль ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК. Актуальність вирішення вказаної проблеми зростає в умовах збільшення питомої ваги в загальній структурі захворюваності інфекцій, спричинених ентеровірусами, що обумовило виконання даного дослідження, його мету і завдання [74, 108].

Зв'язок теми дисертації з науковими програмами, планами, темами установи. Дисертація виконувалася відповідно до плану науково-дослідних робіт (НДР) кафедри неврології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (НМУ імені О.О. Богомольця) та є фрагментом НДР «Клініко-параклінічна характеристика і патогенетичні співставлення у хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу, оптимізація методів лікування та профілактики рецидиву» (термін виконання 2014-2017 рр., № державної реєстрації 0114U001358).

Об'єкт дослідження: ентеровірусні маркери у сироватках крові хворих з ГПМК.

Предмет дослідження: ентеровіруси; присутність геному ентеровірусів у сироватках крові хворих, наявність специфічних антитіл (імуноглобулінів М та G) до ентеровірусів.

Мета та завдання дослідження. Метою досліджень, представлених у дисертаційній роботі, є вивчення ролі ентеровірусної інфекції у розвитку ГПМК.

Завдання дослідження, зумовлені поставленою метою, передбачали:

1. Проаналізувати наукові джерела щодо значення ентеровірусної інфекції у етіопатогенезі судинних захворювань.
2. Виділити ентеровіруси за допомогою класичного вірусологічного методу дослідження з сироваток крові хворих з ГПМК.
3. Ідентифікувати ентеровіруси, виділені з сироваток крові хворих з ГПМК, за допомогою реакції віруснейтралізації.
4. Виявити генетичні маркери виділених штамів вірусів з сироваток крові хворих з ГПМК.
5. Визначити присутність РНК ентеровірусів у сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).
6. Дослідити присутність специфічних імуноглобулінів М та G в парних сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА).

7. Провести порівняльний аналіз результатів дослідження у хворих з ГПМК та осіб з групи порівняння (пацієнти без судинної патології) для вивчення ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК.

Методи дослідження. При проведенні дослідження було використано методи:

- бібліосемантичний – для вивчення вітчизняного та світового досвіду стосовно досліджуваної проблеми;
- вірусологічний (виділення ентеровірусів та їх ідентифікація з вивченням генетичних маркерів);
- молекулярно-генетичний (постановка ПЛР);
- серологічний (постановка ІФА);
- медико-статистичний – для збору, обробки, аналізу отриманої під час дослідження інформації.

Основними джерелами інформації були дані: власно зібрані дані, які ґрунтувались на інформації із первинної облікової документації: “Виписка з медичної карти амбулаторного (стаціонарного) хворого” (ф. 027/о), “Історія хвороби” (ф. 003/о).

В дослідженні джерелами інформації також були дані клінічного обстеження пацієнтів у неврологічному відділенні та відділенні цереброваскулярної патології Олександрівської клінічної лікарні м. Києва; протоколи загальноклінічних лабораторних та функціональних методів дослідження. Використовувались дані наукових бібліографічних баз “PubMed”, “Medline”.

Наукова новизна отриманих результатів.

В результаті проведених експериментальних досліджень вперше було доведено достовірно більшу частоту виділення геномів ентеровірусів з сироваток хворих з ГПМК, ніж у пацієнтів групи порівняння.

Виділено та ідентифіковано штами ентеровірусів з сироваток крові хворих з ГПМК. Встановлено, що досліджені ізоляти ентеровірусів характеризуються певними генетичними характеристиками, які можуть розглядатись як допоміжні при вивченні ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК.

Виявлено присутність специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів у сироватках крові хворих основної групи. Сформульовано припущення про персистуючий характер ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК. Визначено можливу тригерну роль гострої та хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у розвитку ГПМК.

За результатами роботи науково обґрунтовано доцільність застосування поєднання ПЛР для виявлення геномів ентеровірусів та ІФА для виявлення специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів. Застосування вірусологічного методу діагностики з вивченням генетичних маркерів дозволяє проводити внутрішньотипову диференціацію виділених штамів ентеровірусів.

Теоретичне значення одержаних результатів полягає в суттєвому доповненні знань щодо етіології ГПМК, зокрема, у встановленні можливої тригерної ролі ентеровірусної інфекції як пускового механізму у розвитку ГПМК.

Практичне значення одержаних результатів полягає у тому, що основні положення та висновки даного дослідження стали підставою для:

- розробки пропозицій щодо діагностики ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК;
- удосконалення навчальних програм підготовки лікарів на додипломному та післядипломному рівнях на кафедрах мікробіології, вірусології та імунології, нервових хвороб;
- розробки лекційних курсів та написання посібників з мікробіології, вірусології та імунології, нервових хвороб.

На основі результатів дослідження було отримано патент «Спосіб діагностики ентеровірусної інфекції у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу» (93020 UA).

Впровадження результатів дослідження проводилось на галузевому рівні: у навчальному процесі Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова (акти впровадження), при підготовці посібників, лекцій, методичних розробок у курсі викладання мікробіології,

вірусології та імунології у вищих медичних навчальних закладах (ВМНЗ) України.

Особистий внесок здобувача. Молекулярно-генетичні, вірусологічні та серологічні дослідження в рамках дисертаційної роботи були виконані особисто в вірусологічній та генетичній лабораторіях кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Відбір хворих для проведення дослідження та взяття клінічного матеріалу проводилися спільно з к.мед.н., доцентом Н.С. Турчиною, доцентом кафедри неврології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Проведено особисто виділення ентеровірусів з сироваток крові хворих з ГПМК за допомогою класичного вірусологічного методу дослідження та їх ідентифікація за допомогою реакції віруснейтралізації; проведено визначення генетичних маркерів виділених штамів вірусів з сироваток крові хворих з ГПМК; визначено присутність РНК ентеровірусів у сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою ПЛР; проведено порівняльний серологічний аналіз у хворих з ГПМК та осіб з групи порівняння на вміст специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів за допомогою ІФА для визначення етіологічної ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК.

Самостійно здійснено інформаційний пошук, проведено аналіз наукової літератури за проблемою, визначено адекватні завданням методи, виконано математичну обробку експериментальних даних, підготовку публікацій за результатами досліджень.

Планування напрямку роботи, визначення мети і завдань дослідження, аналіз результатів досліджень, їх узагальнення, інтерпретація, формування основних положень та висновків проведено спільно з науковим керівником: академіком НАН та НАМН України, доктором медичних наук, професором Широбоковим Володимиром Павловичем, завідувачем кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Апробація основних положень дисертації. Результати дослідження і основні положення дисертації доповідались та обговорювались на науково-практичних форумах різних рівнів:

- на міжнародному рівні: на міжнародній науково-практичній конференції “Роль та місце медицини у забезпеченні здоров’я людини у сучасному суспільстві” (Одеса, 2013); міжнародній науковій конференції МКМ-2014-021 «Современные исследования медико-биологических наук» (Москва, 2014); на XIV міжнародній науковій конференції “Формування національних і загальнолюдських цінностей у студентів медичних і фармацевтичних вищих навчальних закладів” (Київ, 2014); у матеріалах VI Конгресу Південно-Східно Європейського Медичного Форуму та XIV з’їзду Всеукраїнського лікарського товариства (Одеса, 2015).

Зміст дисертації обговорювався на нараді кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця 28.08.2018 р., протокол №2.

Матеріали дисертації відображені у 12 наукових працях, зокрема в 8 статтях, з яких 5 – у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 1 стаття в іншому періодичному фаховому виданні, 2 статті в зарубіжних наукових журналах (1 у виданні бази SCOPUS), 3 – у тезах та матеріалах конференцій, з’їздів, конгресів. Матеріали дисертації відображені у 1 патенті на корисну модель.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, аналітичного огляду наукової літератури, програми, методів і обсягів досліджень, розділів власних досліджень з аналізом отриманих даних, узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку літератури.

Дисертація викладена на 161 сторінках друкованого тексту (з них обсяг основного тексту – 117 сторінок), містить 17 таблиць, 10 рисунків. Бібліографія включає 289 джерел, з них вітчизняних – 141, зарубіжних – 148.

РОЗДІЛ 1

РОЛЬ ЕНТЕРОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У РОЗВИТКУ ГОСТРОГО ПОРУШЕННЯ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Сучасні погляди на роль інфекції у етіопатогенезі гострого порушення мозкового кровообігу

Розлади мозкового кровообігу є однією з основних причин інвалідності та смертності. За даними ВООЗ, у світі щорічно реєструється 15 млн. випадків інсультів, з яких близько 4,5 млн. випадків закінчуються летально. За даними організації European Heart Network, у структурі смертності від серцево-судинних захворювань чільне місце займають ішемічна хвороба серця, що є причиною смерті 14% чоловіків та 12% жінок, та інсульт, що спричиняє смерть у 7% чоловіків та 10% жінок [20, 208]. В нашій країні судинні захворювання мозку займають також друге місце в структурі причин загальної смертності, ненабагато поступаючись захворюванням серця. При цьому 25% хворих з гострими порушеннями мозкового кровообігу гинуть протягом першої доби, 40% - протягом 2-3 тижнів. Близько 50% осіб, що перенесли ГПМК, вмирають в наступні 4-5 років, а 80% хворих залишаються глибокими інвалідами [29, 175]. Особливо великою є смертність серед людей молодого віку, у яких мозкові інсульти мають тяжкий і досить часто вкрай агресивний перебіг [89]. В Україні загальна летальність при геморагічних інсультах залишається високою — 40,48%. Щороку понад 1000 людей молодого віку помирають від субарахноїдальних крововиливів, до праці стають лише 10-15% осіб [29, 63, 94]. Післяопераційна летальність при геморагічних інсультах становить 56,16%, що є вкрай високим показником [28].

За визначенням, наведеним у роботі Сусліної З.А. та Пірадова М.А., інсульт – це ГПМК, що характеризується раптовою (протягом хвилин, рідше - годин) появою вогнищевої неврологічної симптоматики (рухової, мовної, чутливої, координаторної, зорової та інших порушень) або загально мозкових порушень (зміни свідомості, головного болю, блювоти та ін.), які зберігаються понад 24 години або призводять до смерті хворого у короткий проміжок часу внаслідок причин цереброваскулярного походження [118]. Точнішим є визначення, що дає Вінничук С.М.: «інсульт — це цереброваскулярна катастрофа, синдром швидкого розвитку симптомів та ознак фокальної чи глобальної втрати мозкових функцій з неврологічними симптомами, що

тривають 24 години і більше або призводять до смерті без іншої видимої причини її виникнення» [16].

У структурі судинних захворювань головного мозку провідне місце займають гострі ішемічні порушення мозкового кровообігу. Гостре порушення мозкового кровообігу – поняття більш широке, що включає в себе як інсульт, так і транзиторні ішемічні атаки (ТІА). Інсульт поділяється на геморагічний (крововилив у мозок чи його оболонки) та ішемічний, або інфаркт мозку (ІМ). За даними популяційних досліджень було встановлено наступний розподіл клінічних форм мозкового інсульту у різних країнах: ІМ – 74,3%, внутрішньомозковий крововилив – 16,5%, субарахноїдальний крововилив – 4,0%, інсульт неуточненого характеру – 5,2%. Тому серед хворих з наслідками мозкового інсульту і вираженим ступенем інвалідності переважну більшість становлять особи, що перенесли його ішемічний варіант [47]. Залежно від темпу формування і тривалості неврологічного дефіциту Комітет експертів ВООЗ із судинної патології рекомендує виділяти такі клінічні форми ішемічних ГПМК: ТІА; пролонговані ішемічні атаки з оборотним розвитком, або малий інсульт (minor stroke); прогресуючий ішемічний інсульт (stroke-in-evolution); завершений (тотальний) ішемічний інсульт (major-stroke) [16].

До виникнення ГПМК може призвести ряд факторів ризику. Основні фактори ризику ГПМК поділяють на неконтрольовані (вік, спадкова схильність, стать) і контрольовані (артеріальна гіпертонія, куріння, вживання алкоголю, дисліпідемія, порушення серцевого ритму, цукровий діабет, транзиторні ішемічні атаки та інсульти, застосування оральних контрацептивів) [40]. Ризик розвитку інсульту збільшується з віком, серед хворих старше 65 років він становить 75,0%. З кожним десятиліттям після досягнення віку 55 років ймовірність інсульту підвищується приблизно в 2 рази. Інсульт зустрічається частіше серед чоловічого населення, але жінки складають більше половини всіх померлих від інсульту [40]. Однак результати досліджень показують, що найбільш поширеними факторами ризику розвитку ГПМК у дитячому віці є вроджені вади серця та судинна патологія [265].

Основною етіологічною передумовою розвитку ГПМК у дорослих вважається атеросклеротичний процес у судинах [21, 283]. Відомо кілька десятків гіпотез щодо появи, розвитку та прогресування атеросклеротичного процесу (ліпідно-інфільтративна, запальна, гіпотеза «відповіді на пошкодження» стінок судин, гіпотеза хронічного ураження ендотелію, дисфункції ендотелію, аутоімунна, моноклональна, перекисна, генетична, гормональна, гомоцистеїнемії, впливу вільних радикалів, зниження рівня закису азоту, гіпотеза щодо впливу бактеріальних та вірусних інфекцій), хоча жодна з них не є загально визнаною чи остаточно доведеною [48, 70, 122, 177, 187]. Вказані гіпотези можуть доповнювати одна одну, пояснюючи певні ланки атерогенезу [125, 259, 263, 286]. Водночас, все більше вчених приділяють значну увагу інфекційній теорії розвитку атеросклерозу (АС) [92, 112, 171, 264].

В процесі атерогенезу важливою є роль ендотелію, який є напівселективним бар'єром для дифузії макромолекул з просвіту судин в інтерстиціальний простір. На ранньому етапі запалення, характерному для АС, відбувається адгезія моноцитів до активованих ендотеліальних клітин внаслідок надмірної експресії на їх поверхню молекул адгезії судинних клітин (VCAM) [162]. Уражена стінка судини, окрім місцевої реакції, спричинює значну системну відповідь шляхом виділення молекул адгезії та факторів хемотаксису, прозапальних цитокінів, факторів росту, стимуляції лейкоцитів, виділення кістковим мозком клітин-попередників та їх захоплення судинною стінкою для відновлення гомеостазу [45, 95, 122, 145]. Нейтрофіли виділяють медіатори запалення (протеолітичні ферменти, арахідонової кислоти, еластази, вільних радикалів кисню), чим можуть спричинити інвазію нейтрофілів з подальшим розривом бляшки [254]. Прискорення утворення атеросклеротичних уражень судин також може бути результатом дефіциту секреції Ig M, тоді як підвищений рівень Ig M здатний попередити розвиток запалення, індукований ліпопротеїнами низької щільності (ЛПНЩ) [226]. Проте, за наявності інших факторів ризику (ФР), процес може перебігати

патологічним шляхом, призводячи до деструктивної системної запальної реакції, подальшої диференціації та міграції моноцитів і лімфоцитів крові в субендотеліальний простір судин [2, 70, 147].

Згідно ліпідно-інфільтраційної теорії, виникнення і прогресування АС безпосередньо пов'язано з активацією хронічного запалення [40, 243]. Зазвичай, у неушкодженій інтимі відбувається накопичення ліпідів переважно позаклітинно, тоді як при атеросклеротичному ураженні характерною є наявність клітин з ліпідними включеннями. Ліпоїдоз, або накопичення внутрішньоклітинних ліпідів у клітинах інтими магістральних артерій, вважається на даний час не лише первинною, але й основною ланкою атерогенезу [21]. Атерогенез запускається внаслідок травми або, як згадувалось раніше, дисфункції ендотелію, що призводить до підвищення його проникності, і в субендотеліальному просторі відбувається накопичення модифікованих ліпопротеїдів низької щільності м-ЛПНЩ [69, 114]. Надалі м-ЛПНЩ активують ендотеліальні клітини, зумовлюють експресію молекул міжклітинної адгезії (ICAM) і молекул адгезії судинних клітин (VCAM), моноцитарного колонієстимулюючого фактора (M-CSF), гранулоцитарно-моноцитарного колонієстимулюючого фактора (GM-CSF), тканинного фактора, моноцитарного хемоаттрактивного протеїну (MCP-1), активатора інгібітора плазміногену (PAI-1), які призводять до міграції моноцитів з просвіту судин в субендотеліальний простір і прискорюють диференціацію моноцитів у макрофаги [113].

Частина макрофагів заповнюються великою кількістю м-ЛПНЩ та перетворюються в «пінні» клітини. Інша частина макрофагів під впливом фактору M-CSF не трансформується в «пінні» клітини і надалі секретує прозапальні цитокіни (IL-1b, ФНП-альфа, M-CSF), які збільшують спорідненість ЛПНЩ до ендотелію і гладком'язевих клітин [113, 223, 270].

Хемоаттрактанти, які секретуються макрофагами, активізують гладком'язеві клітини, викликаючи їх міграцію з медіа в інтиму судини. Макрофаги та тучні клітини секретують фактор росту, який викликає

проліферацію гладком'язевих клітин і регулює продукцію позаклітинного матриксу [70]. Окислені ЛПНЩ здатні стимулювати апоптоз, що відіграє важливу роль в дестабілізації атеросклеротичної бляшки. Впродовж останніх десятиліть була розроблена аутоімунна гіпотеза атеросклерозу та накопичені докази щодо важливої ролі аутоантитіл проти модифікованих ЛПНЩ та циркулюючих імунних комплексів, які містять ЛПНЩ, в розвитку атеросклерозу [69, 93, 193, 196, 263].

Значну роль у атерогенезі відіграє запальний процес [67, 113, 222, 225, 249]. Такі фактори як білки гострої фази запалення, зокрема, С-реактивний білок, фібриноген, плазменний амілоїд А та багато інших, можуть ініціювати формування атеросклеротичної бляшки [182, 183, 199, 200]. Одним з потенційно важливих механізмів, що лежать в основі комплексу «запалення-атеросклероз-тромбоз», є ступінь запалення та інфільтрація імунними клітинами, переважно макрофагами та Т-лімфоцитами. Всередині атеросклеротичного ураження антигенпрезентуючі клітини модулюють імунну відповідь, що призводить до еволюції бляшок [7, 40, 212, 224, 279]. Запалення є ключовим моментом у патогенезі цереброваскулярної патології та асоціюється з тяжкістю ГПМК та визначає розвиток ускладнень. Активація клітин вродженого імунітету необхідна для запуску репаративних процесів. Водночас, надмірно виражені та персистуючі запальні реакції також негативно впливають на відновлення ушкодженої нервової тканини [51].

На даний час вплив інфекційних агентів, зокрема, вірусів, які здатні ініціювати запальний процес з подальшим пошкодженням судинної стінки, вважають однією з причин порушення ендотелію судин [80, 117, 122]. У свою чергу це призводить до виникнення ендотеліальної дисфункції, що вважається однією з найбільш ранніх ознак ініціації атеросклеротичного процесу [32, 159, 197, 202, 235]. Значна кількість досліджень вказують на вагомому роль інфекційних агентів у розвитку неінфекційних хвороб. Зокрема, привертає увагу персистуюча інфекція як етіологічний та патогенетичний фактор у розвитку хронічних соматичних захворювань, таких як: атеросклероз судин,

кардит, бронхіальна астма, синдром хронічної втоми, гломерулонефрит, захворювання легень, виразкова хвороба шлунку та дванадцятипалої кишки, онкологічні процеси. На підставі численних досліджень Європейське регіональне бюро ВООЗ виділило у 2003 році групу персистуючих внутрішньоклітинних інфекцій та віднесло їх до захворювань, які визначають майбутнє як інфекційної, так і соматичної патології людини [140].

Персистенцією (від лат. *persistere* – залишатися) називають довготривале перебування збудника в організмі господаря. Персистенція є стратегією виживання патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів у макроорганізмі. З явищем персистенції пов'язані хронічні інфекції, які тривають більше 6 місяців і характеризуються зміною ремісій і загострень, а також виділенням мікроорганізмів упродовж тривалого часу [131]. При персистенції тривале перебування патогену у організмі господаря може не супроводжуватись будь-якими клінічними проявами у разі латентного перебігу або при ремісії інфекційного процесу. Латентною інфекцією є безсимптомна персистенція вірусу, що не супроводжується його виділенням у навколишнє середовище [140]. Однак при певних умовах, таких як імунний дисбаланс внаслідок стресу, переохолодження, загострення хронічних захворювань тощо, відбувається активація персистуючого агента, що призводить до загострення хронічного інфекційного процесу. У механізмі розвитку та активації персистуючої інфекції велике значення має блокування процесу апоптозу клітин макроорганізму [131, 140]. Окрім того, при наявності вірусної персистенції суттєву роль у запуску патологічного каскаду реакцій відіграють цитокіни та фактори місцевого захисту, що стає причиною виникнення хронічного патологічного процесу, якому може також сприяти аутоімунний механізм розвитку [75].

Важливо зазначити, що при латентній інфекції виявити вірус за допомогою існуючих методів діагностики є досить складно, оскільки вірус може перебувати у дефектній формі або бути інтегрованим у геном клітин. Крім того, інфекційний агент може перебувати у вигляді субвірусних

частинок, що вкрай ускладнює діагностику латентних інфекцій. Однак, під впливом певних факторів вірус може виходити і проявляти себе клінічно. На даний час вказаний процес вивчено недостатньо, тому йому не приділяється достатньої уваги у наукових дослідженнях. За формулюванням Фролова А.Ф., «персистенція – це еволюційно сформований на молекулярно-генетичному рівні механізм, що сприяє збереженню збудника як біологічно смистійного виду» [123]. Персистенція розглядається як форма перебування патогенів, зокрема вірусів, в організмі людини і є їх пристосуванням у ході еволюції, яке дозволяє вірусам зберігатись тривалий час у організмі людини та уникати імунного нагляду з боку макроорганізму [123, 140]. У літературі достатньо даних, що підтверджують можливість персистенції ентеровірусів. Зокрема, описаний випадок розвитку «постполіо синдрому» у 49-річної пацієнтки через 36 років після перенесеного гострого паралітичного поліомієліту [123]. Подібна здатність до довготривалої персистенції показана *in vitro* для діабетогенного штаму вірусу Коксакі В4 в клітинах острівців підшлункової залози людини без якихось морфологічних змін у клітинах (за даними електронної мікроскопії) [123]. Як зазначають Фролов А.Ф. та Задорожна В.І., вдосконалення механізмів персистенції може бути для поліовірусу одним із напрямків його збереження як біологічного виду в умовах активного втручання людини в природний епідемічний процес [123].

Наявність персистуючої інфекції у організмі людини спричинює появу хронічного інфекційно-запального процесу, який може призвести до структурних, морфологічних, метаболічних та інших порушень у тканинах та органах організму господаря [123]. Такий інфекційно-запальний процес може бути передумовою та основою формування соматичної патології, зокрема, серцево-судинних хвороб [79, 140, 210, 284]. Це підтверджують дані Плоткіна В.Я. та співавторів, згідно з якими ентеровірусна інфекція спричинює наростання ендотеліальної дисфункції у хворих на інфаркт міокарду незалежно від тяжкості перебігу хвороби тією ж мірою, як і серцева недостатність II–III ступеня (за Killip) у хворих на інфаркт міокарду без

наявності антигенів ентеровірусів у крові. Тому вплив ентеровірусної інфекції і серцевої недостатності у хворих на інфаркт міокарда акумулюється, що призводить до більш вираженої дисфункції ендотелію [139]. Таким чином, наявність хронічної персистуючої інфекції може запустити патологічний процес при наявності передумов для цього, отже, відіграти роль тригера.

Тригерним фактором може бути будь-який провокуючий фактор або дія, що призводить до запуску або прогресування патологічного процесу. Слід акцентувати увагу, що тригерний фактор є додатковим поштовхом, який запускає уже сформований, але досі «дрімаючий» патологічний процес. Отже, основною відмінністю причини хвороби від тригерного фактору, який її запускає, є те, що цей фактор є унікальним для кожного окремого випадку. Тригерні фактори можуть бути різноманітними: віруси, бактерії або ж мікст-інфекції [12, 44, 59, 95, 112].

Близько третини випадків ішемічного інсульту, на думку науковців, може бути спричинено інфекційними агентами як тригерними чинниками у виникненні і прогресуванні запальних процесів у судинній стінці та розвитку атеросклеротичних бляшок [117, 232]. При цьому вагому роль відіграють як гострі, так і хронічні інфекції [6, 58, 167].

Найбільш переконливими є дані щодо інфекційної природи запальних змін при АС, ініційованих вірусами родини Herpesviridae: CMV, HSV 1 та HSV 2, EBV [15, 141, 122, 185, 280, 282, 288].

Розвиток атеросклеротичного процесу може бути спровокований також при одночасній персистенції кількох інфекційних агентів у хворих з вираженою імунореактивністю на фоні генетичної передумовленості та наявності інших ФР [156, 158]. Це підтверджується виявленням Ig G одночасно до кількох інфекційних агентів у сироватці крові хворих на атеросклероз. Вплив кількох інфекційних агентів на розвиток атеросклеротичного процесу отримав у літературі назву «гіпотези інфекційної накладки» [53, 186, 230, 248]. При цьому виникає хронічне запалення з повільним перебігом, що і сприяє розвитку атеросклеротичних змін судинної

стінки [31, 247]. Дослідники вказують на роль хронічної бактеріальної (*Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*) та вірусної (CMV, HSV, вірус Т-клітинної лімфоми людини 1 типу) інфекції у виникненні та прогресуванні АС судин, оскільки вони виявляються в уражених АС судинах та атеросклеротичних бляшках [31, 86, 88, 89, 108, 111, 153, 161, 165, 166, 168, 180, 221, 228, 234, 267]. Також є дані про те, що аденовірусна інфекція причетна до розвитку серцево-судинного захворювання – ГПМК [237].

Раніше перенесена вірусна інфекція, наприклад, грип, може ініціювати розвиток запальних процесів у ендотелії судин та спровокувати виникнення ГПМК [52, 146, 170, 285]. Доведено, що грипозна інфекція навіть у здорових осіб молодого віку впливає на рівень ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ), ЛПНЩ, тригліцеридів, С-реактивного білка, а також молекул адгезії (SICAM-1 і sVCAM-1) [212, 224].

Підтвердженням етіопатогенетичної ролі вірусу грипу у розвитку атеросклерозу є виявлення вірусної РНК вірусів грипу типів H1N1 та H3N3 в атеросклеротичних бляшках разом з нейтрофілами [233]. Є припущення, що віруси грипу здатні до персистенції, довгий час зберігаючись в атеросклеротичних бляшках та сприяючи прогресуванню АС шляхом активації аутоімунних механізмів [170]. Під час грипу відбувається підсилення запальних процесів у вже уражених АС судинах та індукція прокоагулянтних тенденцій у системі згортання крові у зв'язку з його здатністю активувати моноцити, які мають прокоагулянтні властивості, та дестабілізація АС бляшок, що призводить до стрімкого розвитку тромбозу [95]. На думку низки авторів, вірус грипу є предиктором нестабільності атеросклеротичної бляшки та сприяє її розриву, що веде до оклюзії просвіту коронарних судин [95, 146, 170].

Тому реакція запалення, що повинна була б мати захисне значення, натомість провокує розвиток ГПМК та появу різноманітних ускладнень з боку серцево-судинної системи [50, 96, 117, 183].

Важливим аспектом у розвитку персистуючої інфекції, зокрема, HSV 1 та HSV 2, CMV та EBV, відіграє наявність у населення зниження імунної реактивності, зумовленої погіршенням екологічної ситуації, а також виникненням вторинних імунодефіцитів [49, 55, 74, 80, 86, 90, 112]. Епідеміологічні дослідження показують, що дитячі інфекції, зокрема, спричинені вірусом вітряної віспи, пов'язані з підвищеним ризиком розвитку ішемічного інсульту. Герпесвірусна інфекція може призводити до інсульту через системне запалення, що викликане тимчасовим станом гіперкоагуляції, або через пошкодження ендотелію. VZV, член сімейства герпесвірусів, може викликати ГПМК шляхом зараження трійчастого нерву, який забезпечує іннервацію судин мозку, безпосередньо проникати в стінки судини і викликати фокальну артеріопатію. Автори зазначають, що герпесвіруси можуть діяти як тригерний механізм для виникнення ГПМК у дітей. При цьому відсутність інфекційних ознак або симптомів не виключає гострої герпесвірусної інфекції, оскільки у більшості дітей з ГПМК було виявлено у сироватці крові Ig M до VZV в ІФА як свідчення наявної гострої герпесвірусної інфекції [216]. Вірус простого герпесу та CMV є найбільш вивченими збудниками в цьому відношенні [14, 72, 189].

Дослідження показали, що інфікування вірусами типів HSV 1 та HSV 2 призводить до акумуляції ліпідів у судинних клітинах. Інфіковані ними артеріальні гладеньком'язові клітини синтезують менше простацикліну, що сприяє гідролізу ефірів холестерина всередині клітини. Також при герпесвірусній інфекції відбувається активація лейкоцитів з подальшим запальним ураженням ендотелію [14]. CMV може блокувати активність ендотеліального оксиду азоту, призводити до дисфункції ендотелію та запускати атерогенез, індукувати прогресування запалення ендотелію та подальше руйнування тканин [198].

На думку Ліхачова С.А. зі співавторами, виявлення в сироватці крові Ig G і Ig A до вірусних та бактеріальних патогенів, у тому числі їх комбінацій, свідчить про раніше перенесені інфекції і має значення для епідеміологічної

характеристики ІМ як додаткового фактора ризику АС. Оскільки кожна з перенесених людиною інфекцій є потенційним «ударом» по ендотелію судин, що призводить до підвищення рівня прозапальних медіаторів, молекул клітинної адгезії та Р селектину, а також стимулює коагуляційний каскад, агрегацію тромбоцитів, лейкоцитів, сприяє порушенню ліпідного обміну [46].

Дослідження, присвячені вивченню асоціації інфекцій та їх впливу на виникнення інсульту, мають дещо суперечливі висновки. Так, за даними програми дослідження «Framingham Heart Study», що вивчали вплив *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, CMV на виникнення ГПМК, дія цих інфекційних факторів остаточно не була доведена [280]. Натомість, у дослідженні Kis Z. та ін. (2007) було підтверджено асоціацію між рівнем Ig G CMV та Ig A HSV1 та інсультом: рівні Ig G CMV та Ig A HSV1 були значно вищі у хворих на інсульт, ніж у контрольної групи [169]. Отже, актуальність питання щодо наявності зв'язку між вірусними інфекціями та ГПМК підтверджується [213].

За даними програми дослідження «Northern Manhattan Study», поєднання інфекцій, спричинених *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, HSV 1, HSV 2 та CMV, асоціюється з ризиком виникнення першого інсульту, причому, частіше хворіють жінки. Дослідники роблять висновок, що саме поєднання цих інфекцій можна розглядати як ФР та основний незалежний предиктор [231].

Поєднання водночас кількох вірусів було виявлено у 100% випадків у хворих на гострий коронарний синдром з високим ризиком коронарних подій, а саме: HSV 1, HSV 2 та CMV – у 34% випадків; HSV 1, HSV 2 та EV у 10% випадків; CMV та EBV – у 40% випадків; HSV 1, HSV 2, CMV та вірус герпесу 6 типу у 10% випадків; HSV 1, HSV 2, EV, CMV та VZV – у 6% випадків [91].

Вищий загальний рівень виявлення антитіл до вірусних і бактеріальних патогенів також був визначений при ІМ, ніж у контрольній групі здорових осіб ($p < 0,05$), зокрема антитіла до CMV – у 19,3% випадків, до HSV 1 та 2 – у 17,4% випадків, до *H. pylori* – у 17,4% випадків. Дослідники вказали на зв'язок

між виявленням антитіл до вірусних і бактеріальних збудників та наявністю інфекційно-запальних захворювань в анамнезі (за 1-2 місяці до розвитку ІМ) [46].

Ішими дослідженнями продемонстровано, що ризик виникнення ГПМК збільшується впродовж першого року після перенесеної інфекції, спричиненої VZV (від 31% до 45%): у хворих старше 45 років частіше виникають ГПМК ніж у пацієнтів молодше 45 років, у яких частота виникнення останніх не відрізняється від такої в контрольній групі. В старшому віці виникнення інсульту після інфекції, спричиненої VZV, пов'язують з розвитком АС та пригніченням імунного статусу [172, 282].

Водночас, ризик виникнення ГПМК після інфекції, спричиненої VZV, з часом знижується. Найбільшим він є через 4 тижні, дещо меншим через 5-12 тижнів та значно меншим через 13-26 тижнів. Важливо, що противірусна терапія при оперізуючому лишайі знижувала ризик виникнення ГПМК у 55% тих, хто її приймав, порівняно з тими, хто не приймав противірусної терапії [253].

Вірусні, бактеріальні, грибкові та паразитарні інфекції можуть безпосередньо викликати ішемічний або геморагічний інсульт шляхом прямої судинної інвазії, оклюзії або васкуліту. Інші інфекції, включаючи вірусні інфекції верхніх дихальних шляхів, грип, пневмонію та інфекцію сечовивідних шляхів, можуть збільшувати вірогідність виникнення ГПМК, викликаючи системну запальну реакцію, яка призводить до підвищення згортання крові, дестабілізації утворених раніше атеросклеротичних бляшок та місцевого тромбозу [117, 266].

Отже, впродовж останнього десятиліття з'являється більше даних, що не окремі інфекційні агенти сприяють розвитку атеросклерозу через різні механізми, а їх сукупність, що отримало назву «інфекційний тягар». Деякі мікроорганізми, такі як *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*), цитомегаловірус людини та інші, можуть безпосередньо впливати на артеріальну стінку, що призводить до дисфункції ендотелію, формування

«пінних» клітин, проліферації гладком'язових клітин, агрегації тромбоцитів, а також активує цитокіни, фактори росту та продукування молекул клітинної адгезії. Такі мікроорганізми як *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), вірус грипу та інші можуть викликати системне запалення, яке, у свою чергу, може пошкодити судинну стінку (наприклад, цитокінами та протеазами). Крім того, іншим непрямим механізмом, за допомогою якого деякі інфекційні агенти (такі як *H. pylori*, *S. pneumoniae*, збудники пародонтозів тощо) можуть відігравати роль у патогенезі атеросклерозу, є молекулярна мімікрія. Враховуючи складність механізмів, за допомогою яких кожен мікроорганізм може сприяти розвитку атеросклерозу, визначення взаємодії більш інфекційних агентів є набагато складнішим, оскільки проатерогенний ефект кожного з патогенів може бути посилений [230].

Отже, різноманітні інфекційні агенти можуть бути залучені в процес розвитку атеросклерозу. Інфекційні агенти можуть брати участь як прямо, так і опосередковано у розвитку атеросклерозу, зокрема, через активацію механізмів запального процесу. З іншого боку, деякі інфекційні агенти, такі як *H. pylori*, мають деякі особливі механізми впливу на процес атеросклерозу [229]. Наявність в організмі хронічної персистуючої інфекції, при якій відбувається ураження ендотелію, викликає системну імунну відповідь, що або ініціюється патогенними мікробними агентами, або опосередковується включенням аутоімунних реакцій за рахунок механізмів антигенної мімікрії, може слугувати передумовою розвитку атеросклеротичного процесу, наслідком якого може бути ГПМК [117]. Поєднання персистуючої інфекції (наприклад, цитомегаловірусної) з інфекцією, спричиненою вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ), поряд з традиційними ФР, генетичною схильністю може стимулювати запалення, що провокує розвиток АС та призводить до зростання ризику ГПМК [176].

За даними Urbanek С. (2010), виявлення Ig М до мікробних агентів, як маркерів гострої або активації латентної інфекції при інфаркті мозку (ІМ), могло б мати значення не тільки для встановлення ролі інфекції в патогенезі

ІМ у конкретного пацієнта, але і для розробки схем лікування та вторинної профілактики ІМ [285].

В цілому неоднозначність даних досліджень про асоціацію інфекцій та АС може пояснюватись багатьма причинами. Серед них: суб'єктивність інтерпретації серологічних даних; недостатня кореляція між альтернативними методами (електронна мікроскопія, ПЛР та ІФА); тимчасові варіації в титрах антигенів, антитіл, неможливість визначення стану інфекції (латентна, активна, хронічна, первинна, повторна); не повністю дослідження патогенна дія збудників латентних інфекцій, носіями яких є до 100% населення планети, інколи протягом всього життя, як у випадку герпесвірусних інфекцій [186, 248].

1.2. Значення ентеровірусів у виникненні та розвитку серцево-судинної патології

Ентеровіруси – дуже дрібні (20-30 нм у діаметрі) РНК-геномні двадцятигранні віруси, в яких відсутня суперкапсидна оболонка [19, 131]. Ентеровіруси віднесені до роду Enterovirus, родини Picornaviridae. Рід ентеровірусів включає численну групу вірусів, зокрема віруси поліомієліту, віруси Коксакі А і В, віруси ЕСНО, ентеровіруси 68, 69, 70, 71 та деякі інші. Згідно із сучасною класифікацією вірусів, яка базується на критеріях про спільність геномних характеристик, у рід Enterovirus увійшли віруси поліомієліту та 4 групи неполіомієлітних ентеровірусів людини (А, В, С, D) (табл. 1.2.1) [131]. Кожна з груп включає певну кількість серотипів, при цьому кількість серотипів продовжує зростати [164, 205, 219, 239, 261, 272].

Таблиця 1.2.1

Віруси родини Picornaviridae роду Enterovirus

Вид	Серотип
Поліовіруси	1-3

Неполіомієлітні віруси

Група А	16 (Коксакі А: 2-8, 10, 12, 14, 16; Ентеровіруси: 71, 76, 89-91)
Група В	41 (Коксакі В:1-6, Коксакі А: 9; ЕСНО: 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33; Ентеровіруси: 69, 73-75, 77, 78)
Група С	11 (Коксакі А: 1, 11, 13, 15, 17-22, 78)
Група D	Людини – 2 (ентеровіруси 68, 70); мавп – 20; великої рогатої худоби – 2; ентеровірус свиней А - 1; ентеровірус свиней В - 2
Некласифіковані	Понад 20

Таким чином, рід Enterovirus включає в себе біля 100 небезпечних для людини вірусів. Вони широко розповсюджені на Земній кулі та високостійкі до дії на них фізико-хімічних факторів [10, 135].

Дані наукових досліджень свідчать про значну циркуляцію ентеровірусів у об'єктах навколишнього середовища, тоді як відсутні узагальнюючі дослідження щодо вивчення особливостей територіальної поширеності різних серотипів ентеровірусів та їх значення у виникненні епідемічних спалахів [18, 33, 37, 41, 116, 123, 163, 188, 206, 207, 240, 255, 258, 275]. Водночас, є окремі дослідження, присвячені цьому питанню. Так, штамми, що викликали асептичний менінгіт (Йемен, 2010 рік), були віруси ЕСНО 18, ЕСНО 25, а також Коксакі В5 [151]. На півдні Китаю превалюючими штамми, що спричинювали асептичний менінгіт, були ЕСНО

9, ЕСНО 30 та Коксакі В5 [252]. Переважними серотипами ентеровірусів, що циркулювали на Мадагаскарі, є серотипи групи С [218]. В Ірані (м. Ахваз) серозні менінгіти переважно були спричинені вірусом ЕСНО 30 [262]. Вивчення генетичної мінливості та взаємозв'язку штамів вірусу ЕСНО 30 (один з ентеровірусів, що найбільш часто виявляється та є основною причиною менінгіту у дітей та дорослих), виділених з матеріалу хворих на асептичний менінгіт, що виникав у Польщі протягом 20 років, підтвердило високу генетичну різноманітність ЕСНО 30, що може бути суттєвою передумовою появи нових штамів, відповідальних за подальший потенційний спалах асептичного менінгіту [123, 244, 256, 289].

За даними Понятовського В.А. (2016), при вивченні поширеності та рівня контамінації ентеровірусами стічних вод м. Києва протягом 2010-2011 рр. була виявлена висока частота ізоляції (36,5%) та концентрація інфекційних ентеровірусів у стічних водах до 3000 бляшкоутворюючих одиниць в одному літрі (БУО/л). З 23 виділених штамів 8 штамів було ідентифіковано як віруси Коксакі В, 7 штамів – ЕСНО віруси, 2 штами – поліовіруси та 6 штамів – нетиповані ентеровірусні агенти, які при використанні електронно-мікроскопічних методів дослідження були віднесені до ентеровірусів. Було доведено залежність частоти виділення цитопатогенних агентів від сезону року [99].

Дослідники також вказують на відмінності, які визначаються *in vitro* між різними штамами ентеровірусів, зокрема, патогенними та апатогенними. В літературі описані маркуючі генетичні ознаки, які пов'язані з різною чутливістю до фізичних та хімічних взаємодій, здатністю розмножуватися при різних температурах та у присутності різних інгібіторів тощо [19, 23]. Найбільш вживаним для вивчення ступеня вірулентності виділених штамів ентеровірусів є наступні генетичні маркери: здатність розмножуватися у культурі клітин при температурі 40 °С (ознака *t* або маркер *gct*₄₀); ступінь афінітету вірусних часток до бентоніту ($A_{\text{бент}}$); розмір бляшок, які утворюють штами вірусів під бентонітовим чи агаровим покриттям (маркер *S*);

репродукція вірусів за умов низької концентрації у поживному середовищі натрію гідрокарбонату (маркер d) [19, 30, 98].

Дисоціація ентеровірусів під час репродукції на варіанти $A_{\text{бент}^-}$ та $A_{\text{бент}^+}$, вперше була виявлена та описана В.П. Широбоковим [126]. Афінітет до бентоніту як сорбенту залежить від типу вірусів. Високий афінітет до бентоніту мають поліовіруси усіх трьох типів (вакцинні штами), віруси Коксакі А7, А8, А18, Коксакі В3, В4, В6. Такі віруси, як Коксакі А10, Коксакі В1 та В2, мають низький афінітет до бентоніту [61, 126]. Дисоціанти $A_{\text{бент}^+}$ та $A_{\text{бент}^-}$ різняться за своїми властивостями, а саме: вірулентністю, антигенністю та імуногенністю, певним органотропізмом та стійкістю у навколишньому середовищі [8, 11, 61, 64, 65, 66, 77, 110, 124, 128, 129, 130]. За даними літератури, високовірулентні та імуногенні штами ентеровірусів мають низький ступінь спорідненості до бентоніту при слабколужних рН, а також характеризуються як $A_{\text{бент}^-}$ [105, 126]. Віруси з бентонітовим маркером $A_{\text{бент}^-}$ мають зазвичай більший діаметр бляшок та є чутливішими до дії активного хлору. Бентонітовий маркер є інтегральним показником, який свідчить про ряд біологічних властивостей виділених ентеровірусних штамів. Цей маркер використовується при вивченні як клінічних ізолятів, так і виділених із об'єктів зовнішнього середовища (стічних вод) [19, 98, 100].

За висновками Копаниці Л.В. (2003), бентонітовий тест може бути рекомендований для внутрішньотипової диференціації поліовірусів І типу. Проведені дослідження показали, що основна частина польових ізолятів поліовірусів І типу вакцинного походження має генетичний маркер $A_{\text{бент}^+}$ (84,9 %), у той час як штами поліовірусів І типу з характеристиками диких варіантів повністю представлені варіантом $A_{\text{бент}^-}$ (100%) [61]. Також доведена кореляція між гемаглютинуючою активністю вірусів ЕСНО та бентонітовим генетичним маркером: гемаглютинуючі властивості притаманні лише варіанту $A_{\text{бент}^-}$ [34].

Маркер S вперше описаний як властивість атенуйованих штамів ентеровірусів утворювати дрібні бляшки під агаровим покриттям. Віруси

Коксакі та ЕСНО також гетерогенні за величиною бляшок. Наприклад, штам Грегорі вірусу ЕСНО 11 може формувати у моношарі клітин як великі бляшки, так і дрібні, що різняться за своїми біологічними властивостями [19]. Поліовіруси, віруси ЕСНО 7, 8, 12 викликають утворення округлих бляшок з чіткими краями. Для вірусів Коксакі В та більшості вірусів ЕСНО притаманне сповільнене утворення округлих бляшок з розмитими краями [19]. Запропонований В.П. Широбоковим спосіб виявлення бляшок ентеровірусів під бентонітовим поживним покриттям відрізняється більшою чутливістю, швидкістю, простотою та доступністю застосування, ніж під агаровим покриттям. За даними Широбокова В.П., бляшки диких штамів поліовірусів 2 та 3 типів були значно меншими за розмірами, аніж бляшки їх атенуйованих аналогів. Таким чином, бляшки вірулентного штаму Saukett за розміром були малі за розміром, однорідні та з рівними краями. Водночас, штам Себіна цього ж типу поліовірусу викликає появу бляшок, більших за розміром з фестончастим краєм та неоднорідних за величиною. В.П. Широбоков зазначає, що прояв маркера S поліовірусів під бентонітовим покриттям має прямо протилежний прояв порівняно з агаровим покриттям, де більш вірулентні штами індукують бляшки більшого розміру [126]. За даними В.П. Широбокова, бляшки ентеровірусів під бентонітовим покриттям неоднорідні за величиною: на одному й тому ж моношарі клітин одномоментно можуть розвиватися різні за величиною бляшки. Явище гетерогенності ентеровірусних популяцій за маркером S залежить як від властивостей вірусного штаму, так і від умов постановки реакції [19, 126]. Alidjinoу E.K. зі співавторами вказують, що вірус Коксакі В4, який, як відомо, здатний спричиняти ураження підшлункової залози, при тривалому культивуванні у культурі клітин Рапс-1 (лінія клітин раку підшлункової залози людини, виділена з карциноми підшлункової залози протокового клітинного походження) здатний викликати цитопатичну дію, але утворені ним бляшки менші за розміром, ніж бляшки, спричинені вихідним штамом вірусів [257].

Було показано, що штами вірусів Коксакі А7 з ознаками rct_{40}^+ були високонейровірулентними для мавп і дорослих хлопкових щурів та мали виражений міотропізм. Штами з характеристикою rct_{40}^- були апатогенними [19]. До протилежних висновків дійшли інші дослідники при вивченні патогенності для новонароджених мишей «гарячих» та «холодних» мутантів вірусів Коксакі В6. В цьому випадку, на противагу поліовірусам, були патогенними лише «холодні» мутанти, нездатні розмножуватися при температурі 40°C . Пасажі при цій температурі призводили до втрати ними патогенних властивостей [19].

У наукових дослідженнях було доведено, що ознака rct_{40} може змінюватись при культивуванні вірусів Коксакі В5, ЕСНО 11, поліовірусу типу I на різних культурах клітин (HEp-2 та FL). Однак, при їх культивуванні на культурах клітин фібробластів ембріона людини усі вивчені штами ентеровірусів мали однаковий маркер rct_{40}^+ [19].

За даними Понятовського В.А., у виділених зі стічних вод ентеровірусів кількість позитивних маркерів залежала від групи цих вірусів: ізольовані поліовіруси мали усі негативні маркери, у Коксакі В найчастіше реєструвався позитивним маркер S, у ЕСНО вірусів – rct_{40} , у нетипованих – $A_{\text{бент}}^-$. Так, усі три маркери вірулентності були позитивними для 34,8% штамів. Для вірусів Коксакі В такі штами складали 37,5%, ЕСНО – 14,3%, нетипованих вірусів – 67%. Отже, вивчення генетичних факторів мінливості дає лише відносну можливість розподілу ізольованих штамів ентеровірусів на вірулентні та невірулентні [98].

За даними Гриценко Л.М. (2011), штами вірусів ЕСНО типів 6 та 30 мали найбільше розповсюдження в різних регіонах України у 1974-2003 роках. Водночас, більшість цих штамів (66,7%), що були виділені від здорових осіб, мали високий афінітет до бентоніту ($A_{\text{бент}}^+$). Натомість, 63,16 % штамів, які були виділені від хворих осіб, мали низьку здатність до адсорбції на бентоніті ($A_{\text{бент}}^-$) [30]. При визначенні маркеру rct_{40} у вірусів ЕСНО було встановлено, що штами, ізольовані від здорових осіб (72,2%) характеризувались маркером rct_{40}^- ,

у той час як 16,67% вірусних штамів характеризувались маркером gct_{40}^+ . Решта належали до проміжного варіанту маркера gct_{40}^{\pm} . При цьому більшість вірусних штамів, що були ізольовані від хворих осіб, мали переважно маркер gct_{40}^+ (73,68%), 10,53 % штамів мали варіант gct_{40}^- , решта (15,79 %) штамів мали проміжний варіант [30].

Щодо епідеміологічних аспектів захворювань, які спричинені ентеровірусними інфекціями, доведено наступне: виражена сезонність захворювання (літо-осінь); механізм передачі переважно фекально-оральний, реалізується харчовим, водним та контактано-побутовим шляхами [18, 56, 57, 245]. Рідше інфекція передається повітряно-крапельно та трансплацентарно [220]. Мабуть, крапельне потрапляння вірусу до дихальних шляхів людини супроводжується подальшим заносом збудника до ротоглотки, де вже після ковтання він потрапляє у свою екологічну нішу – кишківник, і звідти починається розвиток інфекційного процесу [19, 137]. Також важливою епідеміологічною особливістю ентеровірусів є так зване “здорове вірусоносійство” з довготривалим (приблизно декілька тижнів) виділенням збудника в зовнішнє середовище, що постійно обумовлює виникнення спорадичних захворювань і спалахи масових інфекцій [276].

У свою чергу, ентеровіруси розробили складні стратегії, щоб уникнути протидії імунної системи у захисті від вірусів [242]. Цікавою та характерною властивістю ентеровірусів є їх персистенція в організмі людини [84, 257]. В результаті численних досліджень низкою вчених було доведено справедливості твердження щодо довготривалого перебування в лімфатичній системі вірусів Коксакі В [109, 131]. Саме тому ентеровіруси разом з вірусами грипу є найчастішою причиною госпітальної інфекції [137, 220].

Реплікація ентеровірусів відбувається в епітеліальних клітинах та лімфатичних утвореннях верхніх дихальних шляхів і кишківнику. В подальшому віруси гематогенним шляхом досягають різних органів та систем, уражаючи їх. У такий спосіб спостерігається ураження нервової системи, серцево-судинної системи, органів зору, слизової оболонки рота, ендокринних

органів. Більшість випадків ентеровірусних інфекцій перебігає без симптомів, можливі клінічні прояви у вигляді застудних захворювань, гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ), нерідко з кишковим синдромом [154, 173, 220]. Доведено, що ентеровірусам притаманний поліорганний тропізм: один і той самий серотип ентеровірусу здатний викликати різноманітні клінічні форми захворювання [57, 76, 136, 174, 204, 227, 269, 274].

Розширення вірусологічних досліджень в останні роки засвідчило, що ентеровіруси є не тільки етіологічними чинниками інфекційних процесів, а й мають етіопатогенетичний зв'язок із захворюваннями, які раніше вважались неінфекційними. Була доведена участь вірусів Коксакі А і В та асоціацій із двох-чотирьох серотипів Коксакі А і В у патогенезі багатьох неінфекційних захворювань: інфаркту міокарда, міокардиту, перикардиту, дилатаційної кардіоміопатії, атеросклерозу, юнацького діабету, панкреатиту, нефриту, гепатиту, дерматоміозиту, псоріазу та ін. [4, 25, 38, 39, 62, 76, 87, 105, 106, 127, 132, 134, 136, 150, 157, 179, 195, 201, 278].

Великий спектр захворювань, тісно пов'язаних з ентеровірусами, може бути частково, але не повною мірою, пояснений особливостями тканинного тропізму ентеровірусів [131, 132, 178, 179, 195]. Молекулярні механізми, за допомогою яких ентеровіруси викликають захворювання, досі погано зрозумілі, але є все більше доказів того, що дві ентеровірусні протеази, 2А (pro) та 3С (pro), є важливими посередниками патології. Ці протеази виконують посттрансляційну протеолітичну обробку вірусного поліпротеїну, а також розщеплюють декілька білків клітини-господаря, щоб сприяти виробництву нових вірусних частинок та уникнути клітинних противірусних імунних реакцій. Отже, асоційований з ентеровірусом процесинг клітинних білків може сприяти патології, як це чітко продемонстровано 2А (pro) опосередкованим розщепленням дистрофіну в кардіоміоцитах, що сприяє кардіоміопатії, викликаній вірусами Коксакі. Цілком імовірно, що нові можливості для ідентифікації протеазо-специфічних клітинних мішеней допоможуть виявити нові механізми, що сприяють захворюванню [203].

Частота виявлення ентеровірусів у популяції людей варіює, за даними різних авторів. Так, за даними дослідження Sabrerizo M. та ін., проведеним у 2010-2013 роках у Іспанії, частота виявлення ентеровірусів у фекаліях хворих становила 6,5%, пареховірусів – 2%. Ентеровірусні інфекції виявлялися у всіх вікових групах пацієнтів: новонароджених (17%), дітей від 28 днів до 2 років (29%), дітей 2-14 років (40%) та дорослих (14%). Пареховірусні інфекції були виявлені виключно у новонароджених. Було ідентифіковано 34 різні типи ентеровірусів. Виявлено відмінності у частці виділених типів ентеровірусів залежно від віку та клінічної маніфестації. У новонароджених частіше спостерігались віруси Коксакі В типів 4 і 5, а також пареховірус 3 типу, ніж у пацієнтів старшого віку. У дітей від 28 днів до 2 років переважали віруси Коксакі А 6 та А 16, ЕСНО 5, ЕСНО 18, ЕСНО 25, ентеровірус 71 типу, тоді як у дітей у віці старше двох років і дорослих переважали ЕСНО 6, ЕСНО 20 та ЕСНО 30. Клінічно менінгіт був пов'язаний з ентеровірусами, тоді як енцефаліт був частішим у пацієнтів, інфікованих пареховірусами. Автори зазначають, що віруси Коксакі В були асоційовані з міокардитом (90%), а інші ентеровіруси – із захворюваннями рук, рота та атиповою екзантемою (88%) [251].

На сучасному етапі вивчення вірусів значно розширилось уявлення про етіологічну роль ентеровірусів у серцево-судинних захворюваннях людини [38, 105, 127, 138]. Вивчаючи етіологічну роль ентеровірусів у серцево-судинній патології, не можна ігнорувати те, що ентеровіруси поширені повсюди і супроводжують людину протягом всього життя; мають здатність до генетичних рекомбінацій, що відіграють суттєву роль у їх еволюції [250].

Відомо, що ентеровіруси володіють вираженим тропізмом до тканин серця та постійно інфікують клітини серцевого м'яза і клітини ендотелію судин (зокрема, віруси Коксакі В) [4, 132, 277]. Спочатку у цих клітинах розвиваються альтеративно-деструктивні процеси, обумовлені прямою цитопатичною дією вірусу. В подальшому виникає вірусіндуковане запалення з формуванням міо-, ендо-, епікардиту. Внаслідок запального процесу у

міокарді, що проявляється поширеною інфільтрацією сполучної тканини плазмоцитами та ретикулоцитами (еозинофільними та нейтрофільними гранулоцитами) і лімфоцитами, а також набряком інтерстиціальної тканини, у хворих спостерігається порушення ритму серцевої діяльності та розвиток серцевої недостатності. Ентеровірусний міокардит може ускладнюватись кардіосклерозом, гіпертрофією міокарду, ураженням клапанного апарату, дилатацією шлуночків і гіпертрофічною або дилатаційною кардіоміопатією [1, 4, 136]. Враховуючи вищезазначені наслідки, можна припустити, що ентеровіруси відіграють суттєву роль в розвитку атеросклерозу, гострого коронарного синдрому та інфаркту міокарда [138]. Водночас, хоча ентеровіруси спричиняють досить серйозні міокардити та енцефаліти, які можуть закінчитися летально, дослідники зазначають, що немає достовірної залежності між клінічними проявами та певним генотипом ентеровірусу [273].

Як зазначалось вище, найбільш частою причиною міокардитів є вірусна інфекція, зокрема – ентеровіруси [1, 120]. При ентеровірусних інфекціях відбувається пошкодження клітин міокарду одночасно під впливом декількох механізмів. Стадія віремії зазвичай продовжується приблизно від 1 до 3 діб, на цій стадії захворювання вірус виявляється не тільки в плазмі крові, а й у різних клітинах організму. Реплікація вірусу відбувається в ендотелії, у меншій мірі в клітинах селезінки, печінки, підшлункової залози, серця і навіть у В-лімфоцитах. Процес проникнення до клітини забезпечується його зв'язуванням із специфічними молекулами: CAR (Coxsackievirus/adenovirus receptor) та DAF (decay-accelerating factor – фактор прискореного розпаду). Після того, як вірус проникне до клітини, його нуклеїнова кислота (НК) використовується як матриця для транскрипції та трансляції. Відбувається формування нових вірусних НК та поліпротеїнів, які в результаті процесингу перетворюються на індивідуальні структурні та неструктурні білки під впливом ряду вірусних протеаз. Ці ж протеази забезпечують вихід віріонів з клітини за рахунок модифікації та зміни проникності клітинної мембрани [56, 131, 211, 257]. Відомо, що ентеровірусна РНК в міокарді та специфічні

протівірусні антитіла, які циркулюють в крові, виявляють у здорових людей, проте реплікація ентеровірусів у кардіоміоцитах відбувається і без розвитку міокардиту. Визначальними для виникнення міокардиту є властивості штаму вірусу – його кардіотропність і, особливо, кардіовірулентність (здатність викликати міокардит). Захворювання розвивається лише в тому випадку, коли до міокарду потрапляє кардіовірулентний штам вірусу. В наш час відомо, що кардіовірулентність вірусу може бути генетично закодованою властивістю, мутацією чи видаленням певних ділянок вірусного геному, що різко послаблюють вірулентність вірусів [1, 105, 127].

Рядом досліджень доведено, що ентеровіруси Коксакі В є етіологічним фактором нестабільної стенокардії та міокардиту [66, 120, 127, 138]. При порівнянні результатів вірусологічних та серологічних досліджень з клінічними проявами, характерними для міокардитів, а також із патологоанатомічними змінами, було підтверджено виділення ентеровірусів у біоптаті міокарду та в рідинах перикарду обстежених хворих. Такі зміни можуть обумовлюватись здатністю Коксакі В вірусів індукувати пошкодження епітелію судин та призводити до розвитку атеро- і тромбогенезу при атеросклерозі [139].

При вивченні ревматичних пороків серця та ентеровірусних інфекцій (на матеріалі від 1086 прооперованих хворих) було проведено ряд досліджень, в тому числі серологічні та генетичні. Були зроблені наступні висновки: реплікація ентеровірусів проходить в ендотеліоцитах, фібробластах, міофібробластах та в гладком'язових клітинах з пригніченням функцій ендотелію під дією ентеровірусів в усіх випадках активного ревматизму [82].

На значення ентеровірусів у серцево-судинній патології вказують результати дослідження, згідно яких у обстежених новонароджених дітей та дітей до року з різною серцевою патологією з усіх вірусів, що були виділені, переважали ентеровіруси Коксакі, з меншою частотою виявлялись віруси грипу, CMV, HSV 1 та HSV 2, а також у більшості хворих мала місце змішана

інфекція. Виявлена абсолютна залежність тяжкості ураження серця від активності вірусної інфекції [76, 188].

Найбільша кардіотропність серед ентеровірусів притаманна вірусам Коксакі В, які нерідко є причиною серцевих захворювань [87, 120, 142, 143, 184, 268, 281]. Доведено значення Коксакі В вірусної інфекції у розвитку дилатаційної кардіоміопатії (Амосова К.М., 1988); при різних формах ішемічної хвороби серця (Гіріна О.М., 1996); виявлено зміни ліпідного метаболізму у хворих на нестабільну стенокардію на фоні Коксакі В вірусної інфекції (Амосова К.М. та ін., 2000; Кротенко О.В., 2001) [4, 26, 66, 68].

Вчені отримали дані, що достовірно свідчать про участь ентеровірусних інфекцій в етіопатогенезі гострого коронарного синдрому та його ускладнень. Ентеровірусні антигени прижиттєво виявляли в сироватці 102 (49%) із 208 пацієнтів з гострим коронарним синдромом: у 20 (10%) із 48 хворих з неускладненим інфарктом міокарду, у 68 (32%) із 133 пацієнтів з ускладненим інфарктом міокарду та у 14 (7%) із 27 хворих на нестабільну стенокардію. При цьому, виявлялись антигени вірусів Коксакі В5 в 67 випадках (65,7%), ЕСНО в 32 випадках (31,3%) та інших ентеровірусів у 3 випадках (3%) [138]. За іншими даними, у хворих на дилатаційну кардіоміопатію було виявлено значне підвищення титрів антитіл, які нейтралізували віруси Коксакі В [4].

За даними Зарипової З.А. (2008), у 47,3% пацієнтів з гострим інфарктом міокарду у периферичній крові було виявлено антигени ентеровірусів (за допомогою реакції зв'язування комплексу зі специфічними імунними сироватками). При цьому, відносна кількість ентеровірусів в периферичній крові хворих, які згодом померли від кардіогенного шоку і розриву міокарда, достовірно перевищує відносну кількість вірусу у хворих з неускладненим перебігом інфаркту міокарда і хворих з нефатальними ускладненнями, а збільшення відносної кількості ентеровірусу в периферичній крові може поєднуватися з такими ускладненнями інфаркту міокарда, як кардіогенний шок і розрив [44]. У тканині серцевого м'яза хворих, які померли від кардіогенного шоку і розриву міокарда, антигени ентеровірусів були виявлені

в 57,1% випадків, при цьому відносна кількість вірусу в зонах некрозу суттєво перевищувала відносну кількість ентеровірусу в інтактному міокарді [44]. На думку Плоткіна В.Я. зі співавторами (2016), патогенний вплив ентеровірусів Коксакі В відбувається шляхом руйнування дистрофіну у тканині міокарду [97].

За даними Митрофанової Л.Б. зі співавторами (2009), при імуногістохімічному дослідженні операційного матеріалу правого передсердя та лівого шлуночка у хворих з фібриляцією передсердь (ФП) (10 з них з ревматичною вадою серця і 1 – із сполучнотканинною дисплазією) та в 4 випадках без ФП (3 - з інфекційним ендокардитом та 1 з ішемічною хворобою серця) в усіх випадках було виявлено VP1-антиген ентеровірусів. Зокрема, у середньому в $90,9 \pm 16,2\%$ кардіоміоцитів було визначено експресію VP1-антигену. Ентеровірус був також виявлений у гладком'язевих клітинах і ендотеліоцитах судин правого передсердя та лівого шлуночка, що свідчить про персистуючу ентеровірусну інфекцію. Водночас у 18% випадків у кардіоміоцитах, ендотеліоцитах і лімфоцитах було виявлено аденовірусні антигени [81].

Дослідження засвідчили причетність Коксакі В вірусної інфекції до імунопатогенетичних змін при різних формах ішемічної хвороби серця [25, 26]. При дослідженні впливу вірусів Коксакі В на вміст жирних кислот у мембранах клітин *in vitro* було визначено ліпідомодельючі ефекти Коксакі В вірусів, які при взаємодії з клітинами забезпечували створення зручних умов для проникнення вірусів до клітин за рахунок збільшення плинності мембран, завдяки підвищенню сумарного рівня поліненасичених жирних кислот. Найбільш виразно ліпідомодельюча дія проявляється у вірусів Коксакі В2, Коксакі В3, які, за даними літератури, є максимально кардіотропними та кардіовірулентними. Натомість, атерогенний та ангіотропний вплив найбільше проявляється у вірусів Коксакі В4 [66].

Підтвердженням ролі вірусів Коксакі у судинній патології можуть бути дані опису патологічного стану коронарних судин та аорти при

експериментальному ураженні мишей вірусом Коксакі В4 [17]. Дослідники вважають, що такі морфофункціональні зміни можуть бути зумовлені порушенням судинної проникності у результаті зміни стану тучних клітин, що призводить до метаболічних розладів, в основі яких лежить ішемія [17].

Отже, аналіз даних наукової літератури показав, що пильна увага науковців прикута до вірусів, які здатні до тривалої персистенції в організмі людини, стимуляції запального процесу та процесу атерогенезу, що є значним фактором ризику появи серцево-судинної патології. Водночас, найбільш вивченою є роль герпесвірусної інфекції, зокрема, спричиненої HSV 1, HSV 2, VZV, CMV та EBV [214].

З урахуванням викладеного, вбачається перспективним продовжити вивчення зазначеного напрямку – причетності ентеровірусів до серцево-судинної патології, зокрема ГПМК. Проведення відповідних вірусологічних досліджень, спрямованих на виявлення ентеровірусів як фактора ризику, що впливає на виникнення ГПМК, є необхідним для впровадження корекції лікування та профілактичних заходів даної патології.

Висновки до розділу 1

Проведений аналіз наукових джерел щодо вивчення ролі вірусної, зокрема, ентеровірусної інфекції, у етіопатогенезу ГПМК дозволив зробити наступні висновки:

1. Пошук та аналіз літературних джерел з досліджуваного питання свідчить про відсутність в наукових виданнях комплексних праць на цю тему.
2. Огляд літератури з питань етіопатогенезу ГПМК та судинних захворювань загалом дозволяє зробити висновок, що ентеровіруси, які активно впливають на серцево-судинну систему, можуть бути активаторами патологічних процесів при різних формах ГПМК як однієї з серцево-судинних патологій.

Результати досліджень, представлені у даному розділі, викладені в друкованих працях:

1. Андрюшкова Н.Г. Можливий етіопатогенетичний зв'язок між Коксаки В вірусною інфекцією та гострим порушенням мозкового кровообігу // Актуальные проблемы медицины и биологии. 2007. № 1. С. 88—97.
2. Андрюшкова Н.Г. Роль ентеровірусів в серцево-судинній патології // Медична наука України. 2015. Т. 11, № 1—2. С. 105—109.

РОЗДІЛ 2

ПРОГРАМА, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для досягнення мети дослідження – вивчення ролі ентеровірусної інфекції у розвитку ГПМК – було розроблено відповідну програму дослідження з використанням системного підходу. Програма передбачала сім організаційних етапів, результати кожного з яких ставали логічною підставою для вирішення завдань наступних етапів.

1. Аналіз наукових джерел щодо значення ентеровірусної інфекції у етіопатогенезі судинних захворювань.
2. Виділення ентеровірусів за допомогою класичного вірусологічного методу дослідження із сироваток крові хворих з ГПМК.
3. Ідентифікація ентеровірусів, виділених із сироваток крові хворих з ГПМК, за допомогою реакції віруснейтралізації.
4. Визначення генетичних маркерів виділених штамів вірусів із сироваток крові хворих з ГПМК.
5. Визначення присутності РНК ентеровірусів у сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).
6. Дослідження присутності специфічних імуноглобулінів М та G в парних сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА).
7. Проведення порівняльного аналізу результатів дослідження у хворих з ГПМК та осіб з групи порівняння (пацієнти без судинної патології) для вивчення ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК.

Робота виконувалась сумісно з кафедрою неврології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Молекулярно-генетичні, вірусологічні та серологічні дослідження проводили на базі кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

2.1 Клінічна характеристика обстежених хворих

До дослідження було залучено хворих, які перебували на стаціонарному лікуванні у неврологічному відділенні та відділенні церебро-васкулярної патології Олександрівської клінічної лікарні м. Києва у 2009-2016 роках. До основної групи увійшли 72 хворих з різними формами ГПМК, що відповідали критеріям включення, а саме: вік старше 18 років, верифікований діагноз ГПМК, відсутність критеріїв виключення. Критеріями виключення були: тривалість перебування у стаціонарі менше 2-х тижнів або неможливість відбору сироватки крові з інтервалом у два тижні. Групу порівняння у кількості 35 осіб склали хворі, які проходили стаціонарне лікування з приводу неврологічних хвороб, не пов'язаних з судинною патологією. Згідно з клінічним протоколом, діагноз ГПМК доводився за допомогою магнітно-резонансної томографії, використовувалась шкала тяжкості інсульту Національного інституту здоров'я NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale).

Вік хворих основної групи коливався від 31 року до 86 років, і в середньому склав $62,6 \pm 12,0$ років. До вибірки увійшли 41 жінка (56,9%) і 31 чоловік (43,1%). Група порівняння включала 35 осіб віком від 18 до 88 років, середній вік становив $56,4 \pm 19,3$ роки. До вибірки увійшли 22 жінки (62,9%) і 13 чоловіків (37,1%) (табл.2.1).

На підставі результатів вірусологічного, молекулярно-генетичного та серологічного досліджень основну групу хворих з ГПМК (72 особи) було поділено на наступні підгрупи за лабораторними маркерами наявності ентеровірусної інфекції.

До першої підгрупи увійшли 6 хворих з ГПМК з лабораторними маркерами гострої ентеровірусної інфекції, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виявлено ентеровіруси у сироватках крові, та було виявлено лише Ig M.

До другої підгрупи увійшли хворі з ГПМК з лабораторними маркерами хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення, у яких за

результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виділено ентеровіруси у сироватках крові, та в ІФА визначені лише Ig G до них (4 особи) або Ig M та Ig G до них (4 особи), всього 8 осіб.

До третьої підгрупи увійшли 9 хворих з ГПМК з лабораторними маркерами перенесеної ентеровірусної інфекції, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу не було виявлено ентеровірусів у сироватках крові, однак було виявлено Ig G в ІФА (серопозитивні за Ig G хворі).

До четвертої підгрупи увійшли 3 хворих з ГПМК з лабораторними маркерами ентеровірусної інфекції, у сироватках крові яких за результатами ПЛР було виявлено РНК ентеровірусів, але Ig M та Ig G до них виявлено не було.

До п'ятої підгрупи увійшли хворі з ГПМК, у яких не було виявлено лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції (серонегативні за Ig M та Ig G хворі), всього 46 осіб.

Таблиця 2.1

Розподіл хворих основної групи та групи порівняння за віком і статтю

Групи хворих	Вік	Кількість хворих		Стать			
		Абс.	%	жіноча		чоловіча	
				Абс.	%	Абс.	%
1	2	3	4	5	6	7	8
Основна група	50 років і молодше	11	15,3	7	9,7	4	5,6
	51-60	21	29,2	12	16,7	9	12,5
	61-70	14	19,4	6	8,3	8	11,1
	71-80	20	27,8	11	15,3	9	12,5
	81 і старше	6	8,3	5	6,94	1	1,4
	Всього хворих	72	100	41	56,9	31	43,1

Продовження таблиці 2.1

Групи хворих	Вік	Кількість хворих		Стать			
		Абс.	%	жіноча		чоловіча	
				Абс.	%	Абс.	%

1	2	3	4	5	6	7	8
Група порівняння	50 років і молодше	11	31,4	7	20,0	4	11,4
	51-60	8	22,9	4	11,4	4	11,4
	61-70	7	20,0	5	14,3	2	5,7
	71-80	7	20,0	4	11,4	3	8,6
	81 і старше	2	5,7	2	5,7	0	0
	Всього	35	100	22	62,9	13	37,1
	хворих						

Дослідження проводилось відповідно до вимог стандартів Good Clinical Practice (GCP, належна клінічна практика). Усі хворі були проінформовані про умови проведення вірусологічних, генетичних та імунологічних досліджень та після отримання відповідної згоди пацієнта на участь у дослідженні (діагностиці) підписували інформовану згоду, один примірник якої залишався у хворого.

Дослідження було схвалено Комісією з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол №112 від 31.05.2018).

2.2 Матеріали і методи дослідження

2.2.1 Вірусологічні методи

Матеріалом для дослідження від хворих обох груп була венозна кров з ліктьової вени, взята натщесерце у перші години після госпіталізації та через 10-14 днів для отримання парних сироваток. Кров для дослідження брали з кубітальної вени натщесерце у стерильні центрифужні пробірки. Одержаний матеріал витримували при 4 °С упродовж 1-2 години, потім центрифугували 15-20 хвилин при 1500 об./хв., відокремлювали сироватку, яку переносили в стерильні «пеніцилінові» флакони і зберігали при 4 °С.

Виділення вірусів із сироваток крові, взятої у перші години після госпіталізації, та їх ідентифікацію проводили водночас на трьох культурах

клітин: RD (клітини рабдоміосаркоми людини), як найбільш чутливих до вірусів ЕСНО та деяких вірусів Коксакі А; HEp-2 (Cincinnati, похідні епідермальної карциноми людини), в яких добре розмножуються поліовіруси та віруси Коксакі В, та HeLa (клітини карциноми шийки матки) за загальноприйнятими методами, що рекомендовані ВООЗ [107, 238].

Культури клітин вирощували в полістеролових флаконах з використанням середовищ 199 та RPMI-1640, які містили 10% ембріональної телячої сироватки (Sigma, Німеччина) з антибіотиками пеніциліном та стрептоміцином (100 ОД на мл). Для підтримки життєдіяльності інфікованих клітин використовували вищезгадані середовища з тими ж антибіотиками, але з вмістом ембріональної сироватки 1-2%. Клітини культивували в термостаті при температурі 36,6 °С з пасажами через 2-3 доби, в залежності від інтенсивності росту клітин. Необхідну концентрацію вуглекислого газу підтримували за допомогою CO₂-інкубатору.

Зі скла клітини знімали за допомогою обробки моношарів 0,02% розчину Версену. Підраховували кількість клітин в 1 мл в камері Горяєва та доводили до концентрації 3-5x10⁵ клітин на мл. Підрахунок клітин проводили у 5 великих квадратах (80 маленьких) за формулою (2.1):

$$x = \frac{a \times 4000 \times c}{b}, \quad (2.1)$$

де

x – кількість клітин в 1 мкл,

a – кількість підрахованих клітин,

b – кількість маленьких квадратів (80),

c – ступінь розведення;

1/4000 – об'єм маленького квадрату, при множенні на 4000 приводили до об'єму 1 мкл, для перерахунку на 1 мл – x 10³.

Наявність ентеровірусів визначалась мікрометодом у мікротитраційних панелях на культурах клітин до 100% цитопатичної дії (ЦПД). Оскільки в

клінічному матеріалі віруси виявлялись у низькому титрі, з метою накопичення вірусу робили «сліпі» пасажі вірусу на культурах клітин – до 100% цитопатичної дії (ЦПД) [102, 107].

Пасажі вірусів. Вірусовмісний матеріал попереднього пасажу у кількості 0,2-0,5 мл наносили на моношар клітин, що був вирощений в полістиролових культуральних флаконах з робочою поверхнею 25 або 75 см² після видалення середовища росту та розподіляли по всій поверхні моношару. Адсорбцію вірусу здійснювали в термостаті 30 хвилин при температурі 36,6 °С. Після цього моношар заливали середовищем підтримки та інкубували в термостаті до отримання 100% ЦПД. Отриманий вірусовмісний матеріал три рази заморожували та розморожували для вилучення внутрішньоклітинного вірусу. Вірусовмісний матеріал зберігали при температурі –20 °С.

Визначення титру вірусів. Титр вірусів визначали мікрометодом, принцип якого полягає в тому, що в моношарі клітин, інфікованому вірусом, спостерігається чіткий цитопатогенний ефект, який проявляється повною деструкцією моношару (поява округлих клітин з пікнозом ядра та цитоплазми) [107]. Послідовне 10-кратне розведення вірусів дозволяє виявити максимальне розведення, яке призводить до ЦПД. На підставі цього перераховували титр вірусів, що виражає концентрацію вірусів у певному об'ємі вірусовмісного матеріалу. Для цього здійснювали 10-кратні розведення вірусів у середовищі підтримки, які вносили по 0,1 мл в лунки 96-лункового планшету (по чотирьох лунки на кожне розведення вірусу). Заздалегідь готували суспензію клітин 1×10^5 на 1 мл в середовищі 199 з 1-2% ембріональної телячої сироватки та антибіотиками. В кожну лунку вносили 0,1 мл суспензії клітин. Планшети розміщували у CO₂-інкубатор при 36,6 °С і щодня спостерігали за розвитком ЦПД [107].

Титр вірусу визначали за формулою Кербера (2.2):

$$\lg \text{ТЦД}_{50} = L - d(S - 0,5), \quad (2.2)$$

де:

L – \lg (десятковий логарифм) найменшого розведення, що використовували при титруванні;

d – інтервал в \lg між послідовними розведеннями;

S – сума пропорцій позитивних тест-одиниць, тобто лунок з культурою, де проявився цитопатогенний ефект, в кожному розведенні.

Титром TCD_{50} – вважають концентрацію вірусів в 0,1 мл вірусомісного матеріалу.

Реакція віруснейтралізації (РВН) була використана для визначення типової належності вірусів, виділених із сироваток крові хворих з ГПМК. Реакція віруснейтралізації здійснювалась за загальноприйнятою методикою з використанням діагностичних сироваток до вірусів поліомієліту I-III типів, вірусів Коксакі В 1-6 типів та ЕСНО 1-34 типів виробництва Науково-дослідного інституту поліомієліту і вірусних енцефалітів імені М.П. Чумакова Російської академії медичних наук (РАМН), м. Москва [60]. Для підтвердження типів вірусів сироватки розводили в 1 мл стерильного фізіологічного розчину, одержували робочі розведення, як зазначено в інструкції. Потім сироватки прогрівали при 56°C упродовж 30 хвилин (для позбавлення від вірусних інгібіторів) та використовували в РВН. Для цього в кожному лунку мікротитрувальної панелі вносили по 50 мкл відповідної суміші сироваток. Готували розведення 10^{-3} кожного віруса, що містили 100 TCD_{50} . Вносили 50 мкл цього вірусомісного матеріалу у відповідні лунки. Закривали панелі кришками та витримували 1 годину при температурі 36°C . Під час цього готували клітинну суспензію з концентрацією приблизно $1,5 \times 10^5$ клітин в 1 мл. Додавали по 100 мкл клітинної суспензії до всіх лунок дослідних та контрольних. Ставили контроль: контроль клітин, контроль вірусів, контроль на токсичність сироваток для клітин [107].

Генетичні маркери вірулентності ентеровірусів. Дослідження біологічних властивостей виділених із сироватки крові хворих з ГПМК штамів вірусів проводили шляхом визначення генетичних маркерів, а саме: бентонітовий маркер $A_{\text{бент}}$, що визначає ступінь афінитету до бентоніту;

маркер S, що визначається за розміром вірусних бляшок під бентонітовим покриттям, а також маркер rst_{40} , що є показником здатності вірусів до репродукції при підвищеній температурі (40 °C) [19, 23, 100].

Бентонітовий маркер. Бентонітовий маркер ізольованих ентеровірусів визначали за їх здатністю до адсорбції на бентоніті при слаболужних значеннях рН. Для визначення бентонітового маркеру до 5 мл вірусомісної рідини (середовище Ігла, рН 7,2-7,4) додавали 0,2 мл 5% гелю бентоніту (торгова марка «Синбіогель») до кінцевої концентрації 0,05-0,1% за вмістом сорбенту. Суміш вірус-бентоніт інтенсивно струшували впродовж 7-10 хвилин, після чого центрифугували при 3-4 тис об/хв протягом 10 хвилин.

Проводили порівняльне титрування мікрометодом за TCD_{50} вихідного вірусомісного матеріалу і надосадової рідини після центрифугування системи вірус-бентоніт. Дослідження супроводжували контролем культур клітин. Ступінь адсорбції ентеровірусів на сорбенті оцінювали за зменшенням інфекційного титру в надосадовій рідині. Отримані результати виражали у вигляді величини редукції інфекційного титру (PIT), яку визначали за формулою:

$$PIT = \lg TB_v - \lg TB_n; \quad (2.3)$$

де

TB_v – вихідний титр вірусу;

TB_n – титр вірусу в надосадовій рідині.

Зниження титру ентеровірусів у досліджуваній суспензії на 1-2 lg та більше (адсорбція не менше 90% вірусних частинок) свідчить про високий афінитет до бентоніту (ознака $A_{\text{бент}}^+$). Натомість, зменшення титру на менш як 1 lg свідчить про низьку спорідненість вірусів до бентоніту (ознака $A_{\text{бент}}^-$).

Виявлення ентеровірусних бляшок під бентонітовим поживним покриттям. Цитопатогенні віруси викликають у моношарі перещеплюваних культур клітин ефект бляшкоутворення. Вірусна бляшка – це ділянка клітинного моношару, яка уражена потомством однієї вірусної частинки.

Метод базується на інфікуванні вірусомісним матеріалом моношару чутливих клітин, вирощених на дні колбочок Ерленмейєра. Для отримання вірусних бляшок використовували дводобові негусті моношари клітин. Моношар інфікованих клітин в 50 мл колбочках Ерленмейєра заливали 20-30 мл бентонітового поживного покриття. Дослідження бляшкоутворення супроводжувалось наступними контролями: контроль вірусу у культурі клітин, контроль культури клітин у поживному середовищі та контроль культури клітин під бентонітовим покриттям.

До складу бентонітового поживного покриття входить: бідистильована вода – 415 мл; «Симбіогель» виробництва науково-виробничого об'єднання «Пролісок» (натрієва формула гелю бентоніту 5-6%) – 5 мл; розчин Ерла, десятикратний концентрат – 50 мл; нативна бичача сироватка – 15 мл; 7,5% розчин бікарбонату натрію – 15 мл; пеніцилін – 200 ОД/мл, стрептоміцин – 100 ОД/мл. Частинки бентоніту адсорбуються на поверхні клітин. Під шаром бентоніту у поживному середовищі клітини перещеплюваних культур лишаються життєздатними і прикріпленими до скла впродовж 5-6 діб. Ентеровіруси, що розмножуються у клітинах, не можуть безперешкодно розповсюджуватись по моношару, оскільки адсорбуються на частинках бентоніту. Через 1,5-2 доби після зараження з'являються вірусні бляшки [100].

Маркер S – це властивість атенуйованих штамів поліовірусів утворювати бляшки під бентонітовим покриттям [100]. Визначали маркер, досліджуючи величину бляшок через 48 годин після інфікування моношарів та інкубації в термостаті при 37 °С. Проводили вимірювання діаметру бляшок, після чого вираховували середньоарифметичну величину та середньоквадратичне відхилення. Маркер S вважався позитивним, якщо діаметр бляшок під бентонітовим покриттям дорівнював або був більше за 1,5 мм. За даними літератури, величина бляшок корелює з вірулентністю виділених штамів [24, 100].

Маркер rct₄₀, або ознака t. Ця ознака є маркером зниженої здатності атенуйованих штамів розмножуватися при 40 °С. Даний маркер

визначали методом паралельного культивування та титрування вірусів при 37 °С та 40 °С в культурах клітин HEp-2. Титрування проводили мікрометодом в 96-лункових плашках. Брали 10-кратні розведення вірусу та використовували на одне розведення 4 лунки планшета для визначення титру вірусу. Дослідження супроводжувалось контролем клітин (4 лунки того ж планшета). Інкубували в CO₂ термостаті з концентрацією 5% CO₂.

Облік ЦПД вірусів у культурі клітин проводили на 3-7 добу. При цьому різниця в 5 lg ТЦД₅₀ чи більше вважалась ознакою rct₄₀⁻. Ознаку вважали позитивною (rct₄₀⁺), якщо при температурі 40 °С порівняно з 37 °С титр вірусу не зменшувався більше ніж на 2 lg. Проміжні значення властиві вірусам з маркером rct₄₀[±] [19, 100].

2.2.2 Молекулярно-генетичний метод (полімеразна ланцюгова реакція)

Матеріалом для дослідження у хворих обох груп була венозна кров з ліктьової вени, взята натщесерце у перші години після госпіталізації. Отримана сироватка крові не підлягала спеціальній обробці для екстракції РНК.

З метою встановлення можливої наявності геному ентеровірусів у сироватках хворих було застосовано полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) у варіанті зворотної транскрипції (ЗТ-ПЛР, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) [152]. Виявлення РНК ентеровірусів методом ПЛР зі зворотною транскрипцією з електрофоретичною детекцією включає в себе наступні етапи: екстракція (виділення) РНК зі зразків клінічного матеріалу, отримання кДНК під час реакції зворотної транскрипції, ПЛР-ампліфікація ділянки кДНК даного мікроорганізму та електрофоретична детекція. Екстракція РНК з клінічного матеріалу супроводжувалась контролюми, наданими комерційною тест-системою. Потім з отриманої проби РНК проводиться реакція зворотної транскрипції, у результаті якої отримують кДНК. Проби кДНК використовують для ампліфікації ділянки кДНК

Enterovirus за допомогою специфічних до цієї ділянки ДНК праймерів і фермента Taq-полімерази при трьох різних температурних режимах, що відповідає трьом етапам циклу: денатурація мішені (при 90-95 °С), віджиг (при 40-60 °С) та елонгація праймера (при 72 °С). Специфічний продукт ампліфікації має певний розмір та визначається методом електрофорезу в агарозному гелі. В дослідженні було використано комерційну тест-систему «АмплиСенс» (Федеральна бюджетна установа науки «Центральний науково-дослідний інститут епідеміології Роспотребнадзор», м. Москва). Виділення ентеровірусної РНК з сироватки крові проводилось шляхом афінної сорбції на частинках силікагелю за допомогою набору реагентів «РИБО-сорб» («АмплиСенс», РФ). Ампліфікація вірусної кДНК була проведена на багатоканальному ампліфікаторі «Parkin Elmer 2400» (США) з застосуванням реактивів тест-системи «АмплиСенс Enterovirus-207».

Виявлення продуктів ампліфікації проводилось методом горизонтального електрофорезу у 1,5% агарозному гелі з етидієм бромідом. Наявність смужки чи плями, що світиться в УФ-променях, розміром в 196 нуклеотидів у відповідності з ДНК-маркером свідчила про присутність у матеріалі РНК ентеровірусів. Здійснення обліку результатів було візуальним, за допомогою УФ-транслюмінатора (з довжиною хвилі 254 нм) з використанням червоного світлофільтру. Результати фіксувалися шляхом фотографування.

2.2.3 Серологічний метод діагностики (імуно-ферментний аналіз)

Матеріалом для серологічного дослідження у хворих обох груп була венозна кров з ліктьової вени, взята натщесерце у перші години після госпіталізації та через 10-14 днів. Відібрані сироватки (неінактивовані та без антикоагулянтів) зберігались при -20°C . Серологічне дослідження проводили методом імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням тест-системи Enterovirus ELISA (Ig G Teskit / Ig A Teskit / Ig M Teskit) для визначення імуноглобулінів класу G та M (виробник Sekisui Virotech GmbH, Німеччина), за допомогою якого визначали наявність антитіл (імуноглобулінів класу M та

класу G) в парних сироватках крові хворих основної та порівняльної груп. Облік результатів здійснено на імуноферментному аналізаторі HumaReader («Human GmbH», Germany). Отримані результати для виявлення Ig G інтерпретувались за запропонованою шкалою виробника: як негативні при значенні менше 9,0 VE (Virotech Units), сумнівні – при значенні 9,0-11,0 VE, позитивні – більше 11,0 VE. Обчислювали дані для виявлення Ig G за формулами 2.4 та 2.5, наданими в інструкції виробника:

$$VE(ПК) = \frac{ОЩ(\text{позитивний контроль})}{ОЩ(\text{контроль cut-off})} \times 10 \quad (2.4),$$

де ПК – позитивний контроль.

$$VE(СХ) = \frac{ОЩ(\text{сироватка хворого})}{ОЩ(\text{контроль cut-off})} \times 10 \quad (2.5),$$

де СХ – сироватка хворого.

Обчислювали дані для виявлення Ig M за формулами 2.6 та 2.7, наданими в інструкції виробника:

$$VE(ПК) = \frac{\text{Різниця}(\text{тестове значення} - \text{референтне значення ПК})}{\text{Різниця}(\text{тестове значення} - \text{референтне значення контролю cut-off})} \times 10 \quad (2.6);$$

$$VE(СХ) = \frac{\text{Різниця}(\text{тестове значення} - \text{референтне значення СХ})}{\text{Різниця}(\text{тестове значення} - \text{референтне значення контролю cut-off})} \times 10 \quad (2.7).$$

2.2.4 Статистичний аналіз

Для статистичного аналізу отриманих даних використовували методи варіаційної статистики: оцінки різниці між частотами появи ознаки в окремих серіях спостережень; порівняння середніх величин та середньоквадратичних відхилень [5, 9, 43]. Для оцінки вірогідності різниці показників двох

сукупностей, одержаних в процесі досліджень, визначали ступінь розходження їх середніх значень за допомогою t-критерію Стьюдента [5, 9, 43]. Основні етапи математичного аналізу були такими:

1. Визначення середніх величин M із одержаних показників досліджень M_1, M_2, \dots, M_N за формулою 2.3:

$$\bar{M} = \frac{M_1 + M_2 + \dots + M_N}{N}, \quad (2.3)$$

де N – кількість спостережень.

2. Визначення середньої квадратичної помилки вибіркового середнього (2.4),

$$m = \frac{R}{B}, \quad (2.4)$$

де R – розмах, тобто різниця між максимальною та мінімальною величинами: $M_{\max} - M_{\min}$;

B – коефіцієнт, значення якого визначається числом спостережень N за відповідною таблицею;

одержані величини виражали як $M \pm m$.

Оцінка вірогідності різниці шляхом визначення t-критерію Стьюдента за формулою 2.5:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}} \quad (2.5)$$

При невеликій кількості спостережень для оцінки різниці між частотами появи в окремих серіях середню квадратичну помилку ($n < 30$) визначали за формулою 2.6:

$$Z = \sqrt{\frac{X_1(1-X_1)}{n_1} + \frac{Y_1(1-Y_1)}{n_2}} \quad (2.6)$$

де n – кількість спостережень, X та Y – частота виявлення (в %) окремих ознак в серіях спостережень (X_1, X_2, \dots, X_n).

Потім знаходили нормоване відхилення величини за формулою 2.7:

$$t = \frac{|X_1 - Y_1|}{z}, \quad (2.7)$$

де z – відповідно обчислений раніше коефіцієнт. Потім за табличними даними визначається вірогідність P , що відповідає знайденому значенню t [5, 9, 43].

Статистичну обробку проводили за допомогою стандартного пакету прикладних програм для медико-біологічних досліджень «Statistica 6,0 for Windows», EXCEL.

Кількісну складову експериментальної частини дисертаційного дослідження подано в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Обсяг виконаної роботи

Задачі	Методи дослідження та оснащення	Кількісні показники
1	2	3
Аналіз наукових джерел щодо значення ентеровірусної інфекції у етіопатогенезі судинних захворювань	Бібліосемантичний	289 джерел (вітчизняних – 141, зарубіжних – 148)
Виділення ентеровірусів з сироваток крові	Вірусологічний метод, з застосуванням культур клітин RD, HEp-2, HeLa	Сироватки крові 72 хворих основної групи та 35 осіб групи порівняння (107 сироваток)

Продовження таблиці 2.2

1	2	3
---	---	---

Ідентифікація ентеровірусів, виділених з сироваток крові хворих з ГПМК	Реакція віруснейтралізації на культурі клітин НEr-2 з діагностичними сироватками до вірусів поліомієліту I-III типів, вірусів Коксакі В 1-6 типів та ЕСНО 1-34 типів виробництва НДІ поліомієліту і вірусних енцефалітів імені М.П. Чумакова РАМН, м. Москва.	11 штамів вірусів, виділених з сироваток крові хворих з ГПМК
Визначення генетичних маркерів виділених штамів вірусів	Визначення бентонітового маркера $A_{\text{бент}}$; виявлення ентеровірусних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S); визначення маркера $гст_{40}$.	
Визначення присутності РНК ентеровірусів у сироватках крові	ПЛР у варіанті зворотної транскрипції. Виділення ентеровірусної РНК за допомогою набору реагентів «РИБО-сорб» («Ампли-Сенс», РФ). Ампліфікація вірусної кДНК – на багатоканальному ампліфікаторі «Parkin Elmer 2400» (США) з застосуванням реактивів тест-системи «АмплиСенс Enterovirus-207».	Сироватки крові 72 хворих основної групи та 35 осіб групи порівняння (107 сироваток)

Продовження таблиці 2.2

1	2	3
Дослідження	ІФА (тест-система)	Парні сироватки

присутності специфічних імуноглобулінів М та G в парних сироватках крові хворих з ГПМК	Enterovirus ELISA (Ig G Teskit / Ig A Teskit / Ig M Teskit) для визначення Ig M та Ig G до ентеровірусів (Sekisui Virotech GmbH, Німеччина); імуноферментний аналізатор HumaReader ("Human GmbH", Germany)).	крові 72 хворих основної та 35 осіб порівняльної груп (214 сироваток)
Порівняльний аналіз клініко-лабораторних результатів дослідження у хворих з ГПМК та осіб з групи порівняння	Статистичний метод	107 історій хвороб (медична карта стаціонарного хворого, форма № 003/о)

Висновок до розділу 2

Розроблена програма дослідження, обране методичне забезпечення та обсяги досліджень забезпечили вирішення поставлених завдань, отримання достовірних результатів, які стали основою для твердження про можливу тригерну роль ентеровірусної інфекції як пускового механізму ГПМК.

РОЗДІЛ 3

ВИКОРИСТАННЯ ВІРУСОЛОГІЧНОГО, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ТА СЕРОЛОГІЧНОГО МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ СИРОВАТОК КРОВІ ХВОРИХ НА ГОСТРЕ ПОРУШЕННЯ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ З МЕТОЮ ВИЯВЛЕННЯ ЕНТЕРОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Встановлення імовірної ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК потребувало визначення присутності ентеровірусів та їх РНК у сироватках крові хворих з ГПМК за допомогою ПЛР, застосування вірусологічного методу дослідження з метою виділення вірусних агентів та їх подальшої ідентифікації та вивчення генетичних маркерів, а також визначення специфічних Ig M та Ig G за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА).

3.1 Використання молекулярно-генетичного методу для виділення геному ентеровірусів у сироватках крові хворих на гостре порушення мозкового кровообігу

Для лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій можуть використовуватися наступні підходи: вірусологічний метод для виділення та ідентифікації вірусів, імуноферментні методи виявлення вірусних антигенів або специфічних антитіл, інші серологічні методи для виявлення цих маркерів з застосуванням специфічних антисироваток, електронно-мікроскопічні методи виявлення вірусних часток у пробах, а також методи діагностики за допомогою ЗТ-ПЛР для виявлення вірусних РНК [78, 104]. Окрім того, у зв'язку з низькою концентрацією ентеровірусів у клінічних пробах, безпосередньо перед діагностикою в клінічних лабораторіях нерідко вдаються до попереднього накопичення вірусу на культурах клітин [107]. Останнім часом на перше місце виходить метод ПЛР-діагностики, оскільки він є високочутливий і високоспецифічний та дозволяє провести аналіз проби за 4-6 годин [101].

Для виявлення геному ентеровірусів у сироватках крові пацієнтів з основної групи (72 хворих з різними формами ГПМК) та контрольної групи (35 осіб, які проходили стаціонарне лікування з приводу неврологічних хвороб, не пов'язаних із судинною патологією) було застосовано полімеразну ланцюгову реакцію у варіанті зворотної транскрипції (ЗТ-ПЛР) [152]. Результати електрофорезу для виявлення присутності геному ентеровірусів з використанням ЗТ-ПЛР у досліджуваних сироватках крові представлено на рисунку 3.1.

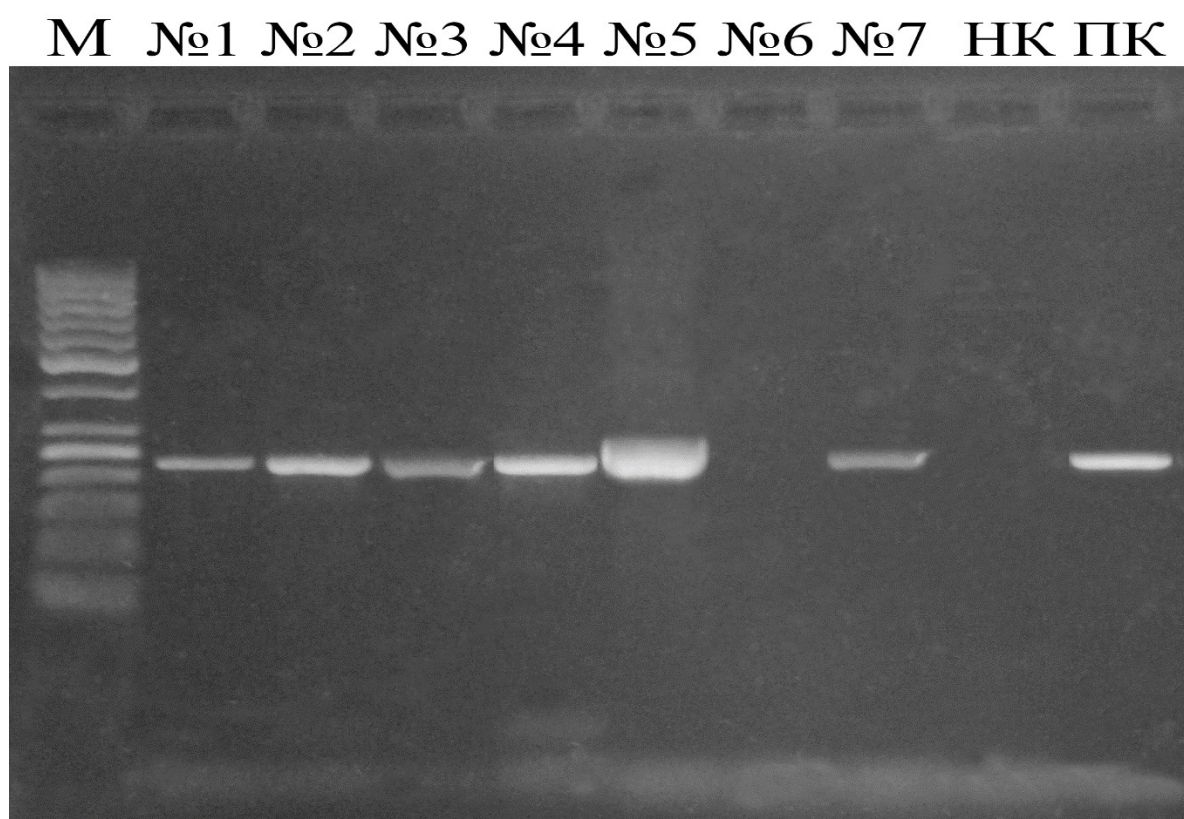


Рис. 3.1. Результати електрофорезу для виявлення присутності геному ентеровірусів з використанням ЗТ-ПЛР у досліджуваних сироватках крові (1-7 – досліджувані проби, з яких у пробі 6 – негативний результат, у пробах 1, 2, 3, 4, 5, 7 – позитивний результат; М – маркер; НК – негативний контроль, ПК – позитивний контроль).

За результатами власних досліджень було встановлено, що ентеровірусний генوم присутній у сироватках крові 17 із 72 хворих основної групи ($23,6 \pm 5,1\%$). З 35 осіб групи порівняння лише у сироватці крові одного хворого був присутній генوم ентеровірусів ($2,9 \pm 2,8\%$), $p < 0,05$ (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Виявлення геному ентеровірусів у сироватках крові осіб у основній та порівняльній групах

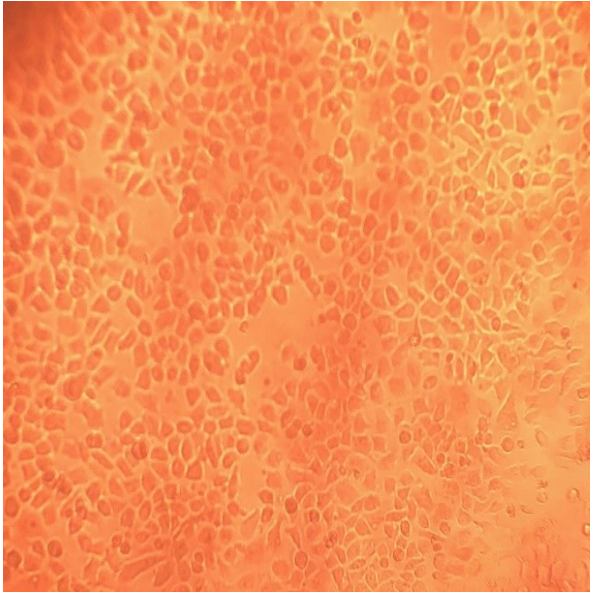
Результати молекулярно- генетичного дослідження	Результати			
	Число осіб основної групи		Число осіб групи порівняння	
	абс.	% ($M \pm m$)	абс.	% ($M \pm m$)
ПЛР +	17	$23,6 \pm 5,1$	1	$2,9 \pm 2,8$
ПЛР –	55	$76,4 \pm 5,1$	34	$97,1 \pm 2,8$
Всього	72	100	35	100

3.2. Використання вірусологічного методу для виділення та ідентифікації ентеровірусів із сироваток крові хворих на гостре порушення мозкового кровообігу

Найчастіше для виділення та ідентифікації ентеровірусів застосовують перещеплювані лінії клітин людини і мавпи, які мають специфічні рецептори ліпопротеїдної природи та на яких адсорбуються дані віруси [190]. Число таких ліній клітин, що використовуються в сучасній лабораторній практиці, постійно збільшується, а тому виникає необхідність проведення порівняння їх чутливості до певних вірусних агентів [3, 119].

Для виділення неполіомієлітних ентеровірусів ВООЗ рекомендує культури клітин RD, HEp-2 [107]. Водночас, дослідники вказують на можливість використання для виділення ентеровірусів й інших культур клітин, зокрема: MRC-5, GMK, A549, CaCo-2, Vero, L20B, BGM, HeLa [3, 98, 144, 276]. Для виділення ентеровірусів було використано три лінії культур клітин: RD, HEp-2 та HeLa, які представлено на рисунку 3.2.

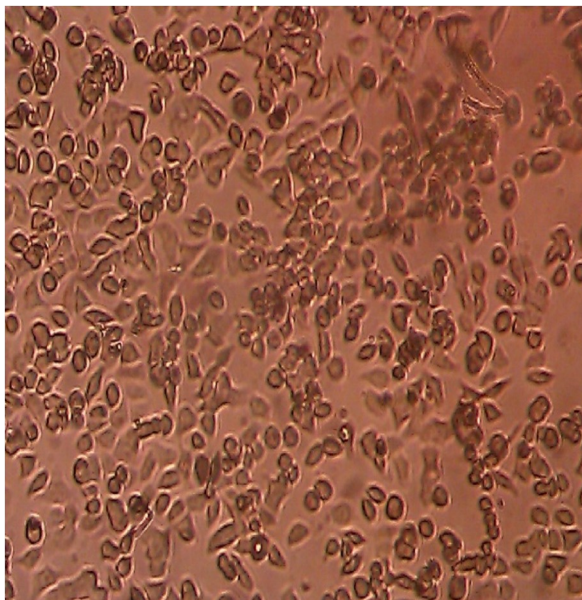
Про наявність цитопатогенних агентів у сироватках крові хворих свідчила цитопатична дія в культурі клітин за типом повної деструкції моношару (рис.3.3).



а)



б)



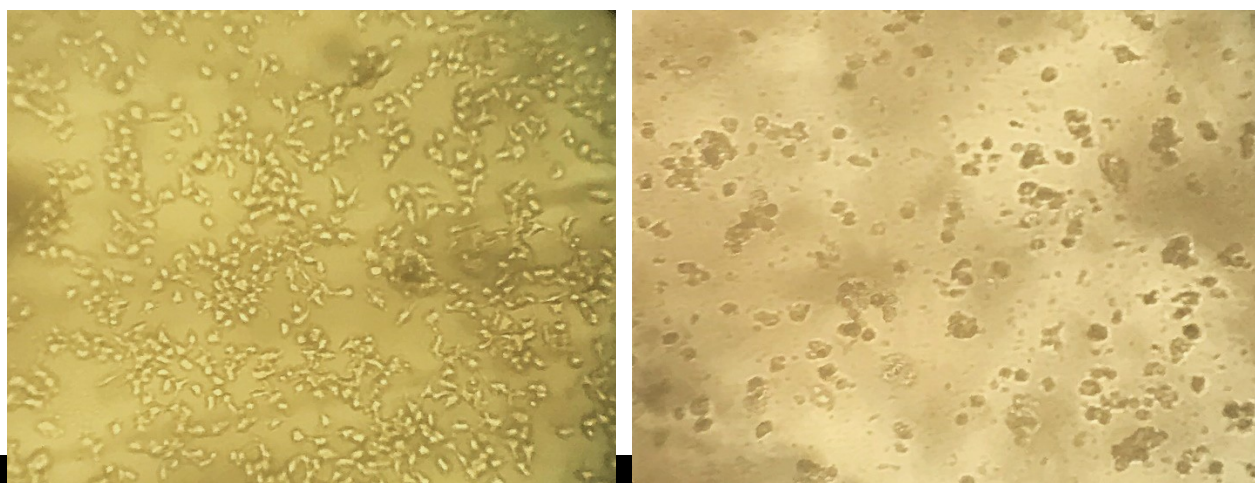
в)

Рис. 3.2. Моношар культури клітин: а) HEp-2 (збільшення x 80); б) RD (збільшення x 80); в) HeLa (збільшення x 80).

Слід зауважити, що віруси Коксакі В переважно були виділені на клітинах HEp-2. Натомість віруси ЕСНО краще спричинювали цитопатичний

ефект на культурі клітин RD та дещо менше – на HeLa та HEp-2. Нетиповані ентеровіруси було виділено на клітинах RD (2 штами), а 1 штама – на культурах клітин RD і HEp-2.

Інтенсивність розвитку та проявів ЦПД залежала від культури клітин та типу ентеровірусів. Вже через 24 години після інфікування моношару цитодеструкція найінтенсивніше була виражена в клітинах HEp-2 та проявлялась подвійним світлоломленням цитоплазми клітин, появою у моношарі клітин з зернистістю та подальшою круглоклітинною дегенерацією (рис. 3.3).



а)

б)

Рис. 3.3. Прояв цитопатичної дії ентеровірусів у вигляді повної дегенерації моношару культури клітин HEp-2 (збільшення $\times 80$): а, б – цитопатична дія у динаміці.

За допомогою класичного вірусологічного методу дослідження було виділено на культурах клітин 11 цитопатичних вірусних агентів із сироватки крові хворих основної групи. Виділити цитопатичні вірусні агенти із сироватки крові у осіб групи порівняння не вдалося. Порівняльна кількісна характеристика наведена в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Виявлення цитопатичних вірусних агентів у сироватках крові осіб основної та порівняльної груп

Результати вірусологічного дослідження	Кількість осіб у основній групі		Кількість осіб у групі порівняння	
	абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)
Виділено ентеровіруси	11	15,3±4,2	0	0
Не виділено ентеровірусів	61	84,7±4,2	35	100
Всього	72	100	35	100

Порівняння та аналіз отриманих даних молекулярно-генетичного та вірусологічного методів дослідження, результати яких були наведені раніше у таблицях 3.1 та 3.2, дозволив встановити, що із сироватки крові 17 ПЛР-позитивних хворих основної групи виділити вдалося 11 цитопатогенних агентів, тоді як з інших 6 ПЛР-позитивних сироваток крові хворих основної групи цитопатогенні агенти виділити не вдалося. З однієї ПЛР-позитивної сироватки крові хворого групи порівняння також не було виділено вірусів.

Інтерпретуючи отримані результати, варто зауважити, що виявлення ентеровірусів у основній групі хворих є достовірно вищим, ніж у контрольній ($p < 0,05$), як це представлено на рисунку 3.4.

З урахуванням того, що метод ЗТ-ПЛР є більш чутливим та дозволяє в більш короткі терміни отримати результати щодо наявності ентеровірусів, він може бути рекомендований як метод вибору при діагностиці ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК.

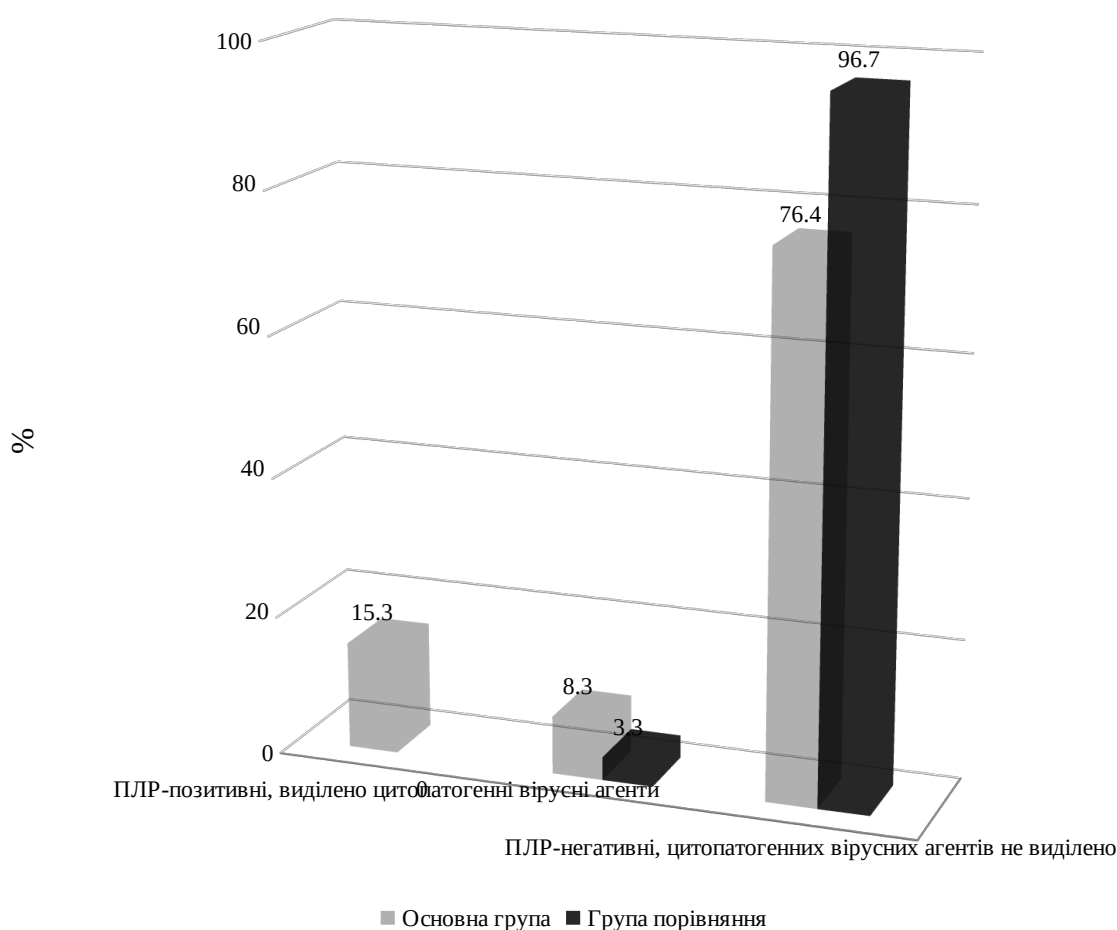


Рис. 3.4. Порівняння частоти виявлення ентеровірусів за допомогою ПЛР та класичного вірусологічного методу у хворих з ГПМК

3.3 Серологічна ідентифікація виділених цитопатичних агентів за допомогою реакції віруснейтралізації на культурі клітин

Для серологічної ідентифікації виділених штамів було застосовано реакцію віруснейтралізації з використанням діагностичних сироваток до вірусів поліомієліту I-III типів, вірусів Коксакі В 1-6 типів та ЕСНО 1-34 типів. Вдалося протипувати вісім виділених штамів, тоді як три штами не нейтралізувалися набором використаних діагностичних сироваток, тому були віднесені до групи нетипованих ентеровірусів.

Виділені штами вірусів були ідентифіковані в реакції віруснейтралізації як віруси Коксакі В (серотипи 2, 3, 4) та віруси ЕСНО (серотипи 6, 9, 27 (два штами), 29) (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Виділені штами ентеровірусів від хворих на гостре порушення мозкового кровообігу

Серотипи ентеровірусів, ідентифіковані в реакції вірусанейтралізації	Кількість штамів, абс. число
Коксакі В2	1
Коксакі В3	1
Коксакі В4	1
ЕСНО 6	1
ЕСНО 9	1
ЕСНО 27	2
ЕСНО 29	1
Не ідентифіковано	3
Всього	11

З виділених ентеровірусів віруси Коксакі В склали 27%, віруси ЕСНО – 46% та неідентифіковані ентеровіруси (цитопатогенні агенти) – 27% (рис. 3.5).

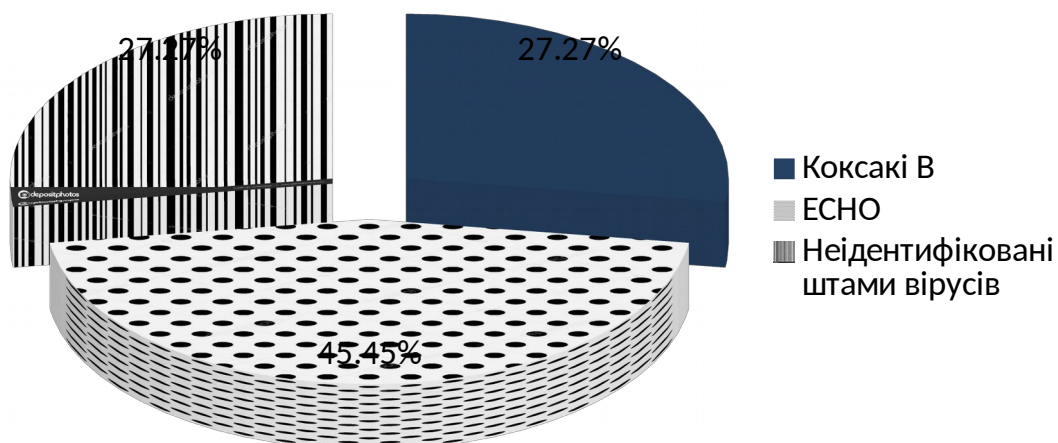


Рис. 3.5. Питома вага різних серогруп ентеровірусів, виділених з крові хворих з ГПМК.

Отримані дані свідчать про циркуляцію вірусів серед населення та їх роль у виникненні судинної патології, зокрема, ГПМК. Зважаючи на фекально-оральний механізм передачі ентеровірусної інфекції як основний та

його широке розповсюдження у зовнішньому середовищі, цікавим було порівняти серотипи, що є клінічними ізолятами, та ізоляти вірусів, виділені з оточуючого середовища. Адже, спираючись на дані порівняльного аналізу зразків клінічних проб та проб стічної води, проведених Gerald Sedmak et al., можна стверджувати, що серотипи ентеровірусів, які виявляються у стічних водах, найчастіше, зазвичай, відповідають серотипам клінічних ізолятів вірусів. Так, автори виділяли віруси ЕСНО 6, ЕСНО 11, ЕСНО 13, ЕСНО 30, Коксакі В5 у 1997-2001 рр. як із стічних вод, водопровідної води, так і з клінічного матеріалу [13, 24, 271].

За даними Гіріна В.Н. (1982), у стічних водах м. Києва частіше всього виділялися наступні ентеровіруси: поліомієліту I-III типів, Коксакі В1, В4, віруси ЕСНО серотипів 10, 11, 12, 24 [24].

За даними Понятовського В.А. (2014), у стічних водах м. Києва з 23 виділених штамів ентеровірусів 8 штамів було ідентифіковано як віруси Коксакі В (34,7%), 7 штамів – як ЕСНО віруси (30,4%), 2 штами – як поліовіруси (8,7 %) та 6 штамів було віднесено до нетипованих вірусних агентів (26,1%). Останні були віднесені до ентеровірусів за результатами електронно-мікроскопічного дослідження [99]. Серед 8 виділених вірусів Коксакі В були серотипи Коксакі В5 (4 штами), В4 (2 штами), В1 (1 штама) та В6 (1 штама). Серед вірусів ЕСНО виділялися ЕСНО 5 (1 штама), ЕСНО 7 (1 штама), ЕСНО 11 (1 штама) [99].

За результатами власних досліджень, з клінічного матеріалу було виділено та ідентифіковано віруси Коксакі В2, В3, В4 та віруси ЕСНО 6, 9, 27 (два штами), 29. Отже, лише варіант Коксакі В4 співпав з даними Понятовського В.А. Крім того, показано, що виявлення геному ентеровірусів за допомогою методу ПЛР має вищу чутливість, аніж виділення вірусу на культурах клітин. Водночас, вірусологічне дослідження, що базується на виділенні ентеровірусів на культурах клітин та ідентифікації в реакції віруснейтралізації, залишається «золотим стандартом» для діагностики ентеровірусних інфекцій.

3.4 Характеристика фенотипових властивостей виділених штамів вірусів шляхом визначення генетичних маркерів вірулентності

Генетичні маркери вірулентності ентеровірусів дозволяють встановити їх внутрішньотипові відмінності, у зв'язку з чим їх доцільно застосовувати з метою диференціації не лише «диких» та вакцинних штамів поліовірусів, але і для визначення ступеня вірулентності та фенотипових властивостей неполіомієлітних ентеровірусів у лабораторних умовах [24, 100, 126, 129]. Більше того, спільність ознак за генетичними маркерами може свідчити про існування особливої групи ентеровірусів, які можуть відігравати роль тригерних факторів при ГПМК.

Серед різних генетичних маркерів, що пропонувались для визначення патогенності ентеровірусів, найбільшого значення набули бентонітовий маркер ($A_{\text{бент}}^+$ та $A_{\text{бент}}^-$), величина бляшок ентеровірусів під бентонітовим поживним покриттям (маркер S) та зниження здатності атенуєваних штамів розмножуватися при 40°C (rct_{40}^+ та rct_{40}^-) [24, 100]. Комплексне використання генетичних маркерів для визначення фенотипових властивостей та ступеню вірулентності виділених штамів вірусів є більш оптимальним, аніж застосування якогось маркера окремо [24, 100, 126, 129]. Варто підкреслити, що використання генетичних маркерів виділених штамів ентеровірусів має на меті не стільки визначення ступеню вірулентності, як фенотипову характеристику виділених штамів, яка, безумовно, базується на генетичних засадах. Така фенотипова характеристика необхідна для групування вірусів, що, можливо, відіграють тригерну роль у розвитку ГПМК.

Результати дослідження генетичних маркерів вірулентності ентеровірусів, виділених із сироватки крові хворих з ГПМК, продані у таблиці 3.3.

Таблиця 3.3.

Генетичні маркери вірулентності вірусів, виділених із сироватки крові хворих з ГПМК

Виділений штам вірусу	Бентонітовий маркер ($A_{\text{бент}}^+ / A_{\text{бент}}^-$)	Маркер S («+» ; «-»)	Маркер t (rct_{40}^+ / rct_{40}^-)
Коксакі В2	$A_{\text{бент}}^-$	-	rct_{40}^+
Коксакі В3	$A_{\text{бент}}^-$	-	rct_{40}^+
Коксакі В4	$A_{\text{бент}}^-$	+	rct_{40}^+
ЕСНО 6	$A_{\text{бент}}^-$	-	rct_{40}^+
ЕСНО 9	$A_{\text{бент}}^-$	-	rct_{40}^+
ЕСНО 27 (1-й штам)	$A_{\text{бент}}^-$	-	rct_{40}^+
ЕСНО 27 (2-й штам)	$A_{\text{бент}}^-$	-	rct_{40}^+
ЕСНО 29	$A_{\text{бент}}^-$	+	rct_{40}^+
Неідентифікований 1	$A_{\text{бент}}^-$	-	rct_{40}^+
Неідентифікований 2	$A_{\text{бент}}^-$	+	rct_{40}^+
Неідентифікований 3	$A_{\text{бент}}^+$	-	rct_{40}^+

Виділені із сироватки крові хворих з ГПМК віруси мали наступні генетичні маркери: 10 з 11 вірусів мали бентонітовий маркер $A_{\text{бент}}^-$ (90% штамів), і лише один з неідентифікованих вірусів мав маркер $A_{\text{бент}}^+$, що підтверджує дані про більшу вірулентність генетичного варіанту $A_{\text{бент}}^-$ ентеровірусів, аніж варіанту $A_{\text{бент}}^+$. Так, за даними Євтушенко О.І. (2007), генетичний варіант $A_{\text{бент}}^-$ ентеровірусів був більш вірулентним в експерименті для вагітних мишей у порівнянні з варіантом $A_{\text{бент}}^+$, спричиняючи важчий перебіг захворювання та летальний наслідок у 69% вагітних самок, тоді як варіант $A_{\text{бент}}^+$ обумовлював летальність у 6,3% тварин [36].

Варто зазначити, що у всіх 100% штамів вірусів, виділених із сироватки крові хворих з ГПМК, був виявлений позитивний маркер rct_{40}^+ . За розміром бляшок, що утворились під впливом вірусів, було поділено віруси на дві групи: такі, що індукували появу дрібних бляшок розміром до 1,5 мм (маркер S-), та такі, що індукували появу великих бляшок розміром від 1,5 мм і більше (маркер S+) (рис.3.6).

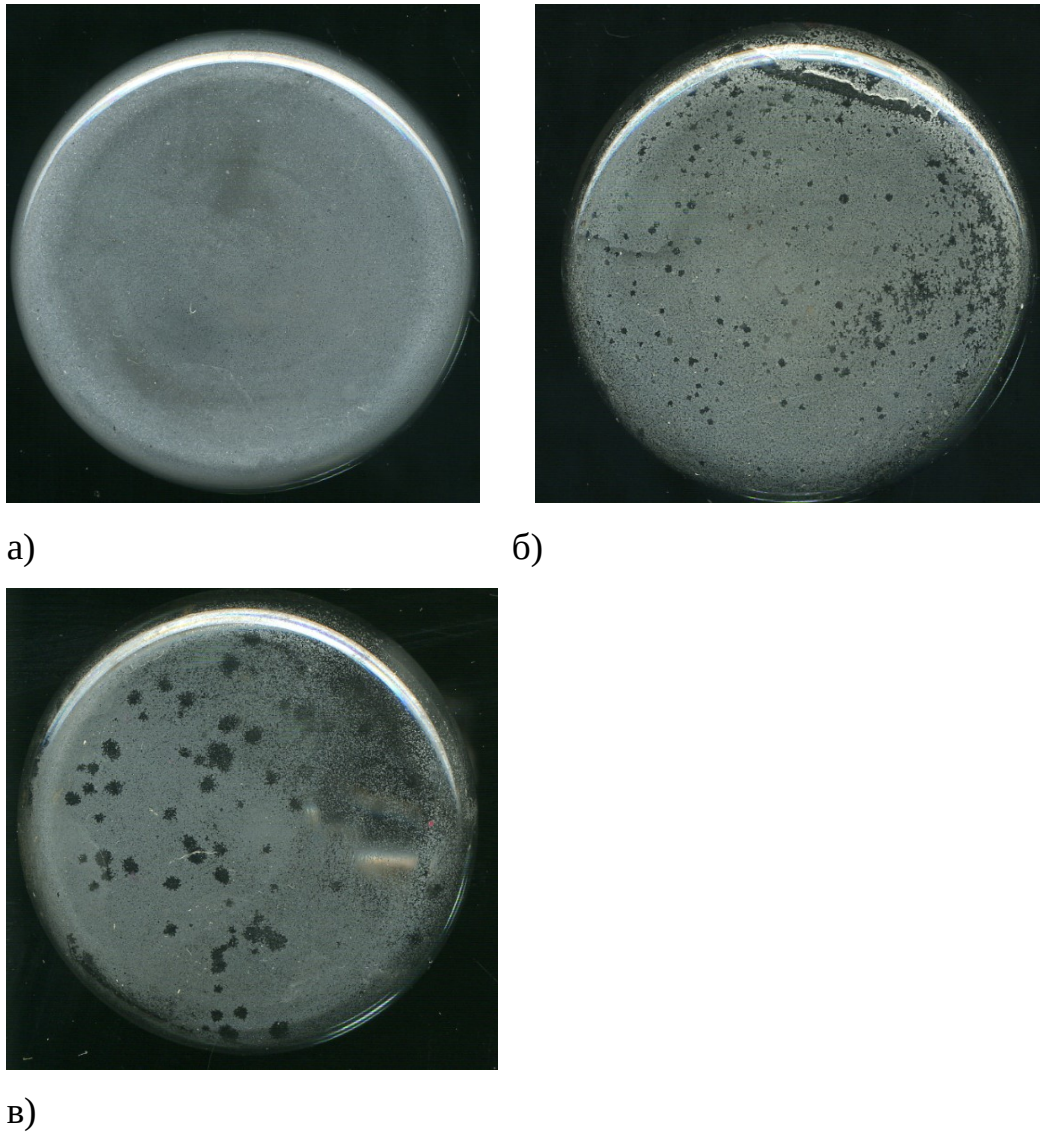


Рис. 3.6. Реакція бляшкоутворення під бентонітовим поживним покриттям у культурі клітин HEp-2: а) контроль моношару клітин під бентонітовим поживним покриттям; б) утворення дрібних бляшок під впливом вірусу Коксакі В3; в) утворення великих бляшок під впливом вірусу Коксакі В4.

Лише у трьох досліджених ізолятів був виявлений маркер S⁺ (штами ЕСНО 29, Коксакі В4 та один неідентифікований штам), у більшості ж він був S⁻. Отже, виділені нами штами ентеровірусів індукують появу дрібних бляшок під бентонітовим покриттям, які, за даними В.П. Широбокова та В.Н. Гіріна, асоціюється з вірулентністю цих штамів, що дозволяє припустити їх роль у етіопатогенезі розвитку ГПМК [19, 126]. За твердженням В.П. Широбокова, прояв маркеру S поліовірусів під бентонітовим покриттям має

прямо протилежний прояв порівняно з агаровим покриттям, де більш вірулетні штами індукують бляшки більшого розміру [126].

В літературі відсутні дані про корелятивний зв'язок між величиною бляшок та вірулентністю у вірусів Коксакі і ЕСНО. За висновками В.П. Широбокова та В.Н. Гіріна, бляшки ентеровірусів під бентонітовим покриттям неоднорідні за величиною: на одному й тому ж моношарі клітин одномоментно можуть розвиватися різні за величиною бляшки. Явище гетерогенності ентеровірусних популяцій за маркером S залежить як від властивостей вірусного штаму, так і від умов постановки реакції [19, 126].

За нашими даними, 7 штамів ентеровірусів (63,6%), виділених із сироватки хворих з ГПМК, а саме: Коксакі В2, В3, ЕСНО 6, ЕСНО 9, ЕСНО 27 (обидва ізоляти) та один неідентифікований вірус, мали позитивними всі три маркери вірулентності: $A_{\text{бент}}^-$, rct_{40}^+ та викликали появу дрібних бляшок у культурі клітин під бентонітовим покриттям (маркер S-). Три штами виділених ентеровірусів характеризувались двома маркерами вірулентності, а саме: Коксакі В4 мав маркери $A_{\text{бент}}^-$, S+, rct_{40}^+ , один з неідентифікованих штамів ентеровірусів мав маркери $A_{\text{бент}}^-$, S+, rct_{40}^+ , а інший неідентифікований вірус мав маркери $A_{\text{бент}}^+$, S-, rct_{40}^+ .

Отже, наші дані щодо низького афінітету до бентоніту ($A_{\text{бент}}^-$) у 10 з 11 вірусів (90,9%), виділених із сироватки крові хворих з ГПМК, співпадають з даними Л.М. Гриценко (2011), згідно яких більшість (63,16%) штамів вірусів ЕСНО, виділених від хворих осіб, мали низьку здатність до адсорбції на бентоніті ($A_{\text{бент}}^-$) [30].

Водночас, всі 11 вірусів, виділених із сироватки крові хворих з ГПМК, за нашими даними, мали маркер rct_{40}^+ (рис. 3.7). Це узгоджується з даними Л.М. Гриценко (2011), яка виявила, що штами, ізольовані від здорових осіб (72,2%) характеризувались маркером rct_{40}^- , у той час як 16,67% вірусних штамів характеризувались маркером rct_{40}^+ . При цьому більшість вірусних штамів, ізольованих від хворих осіб, мали переважно маркер rct_{40}^+ (73,68%),

10,53% штамів мали варант rct_{40}^- , решта (15,79%) штамів мали проміжний варіант [30].

При співставленні наших результатів з даними В.А. Понятовського, що відзначав у виділених зі стічних вод ентеровірусів залежність кількості позитивних маркерів від групи цих вірусів, нами не було виявлено певної закономірності щодо притаманності тих чи інших маркерів вірулентності групам вірусів, що може бути пояснено невеликою кількістю досліджених штамів та різними об'єктами, з яких було виділено віруси [98].

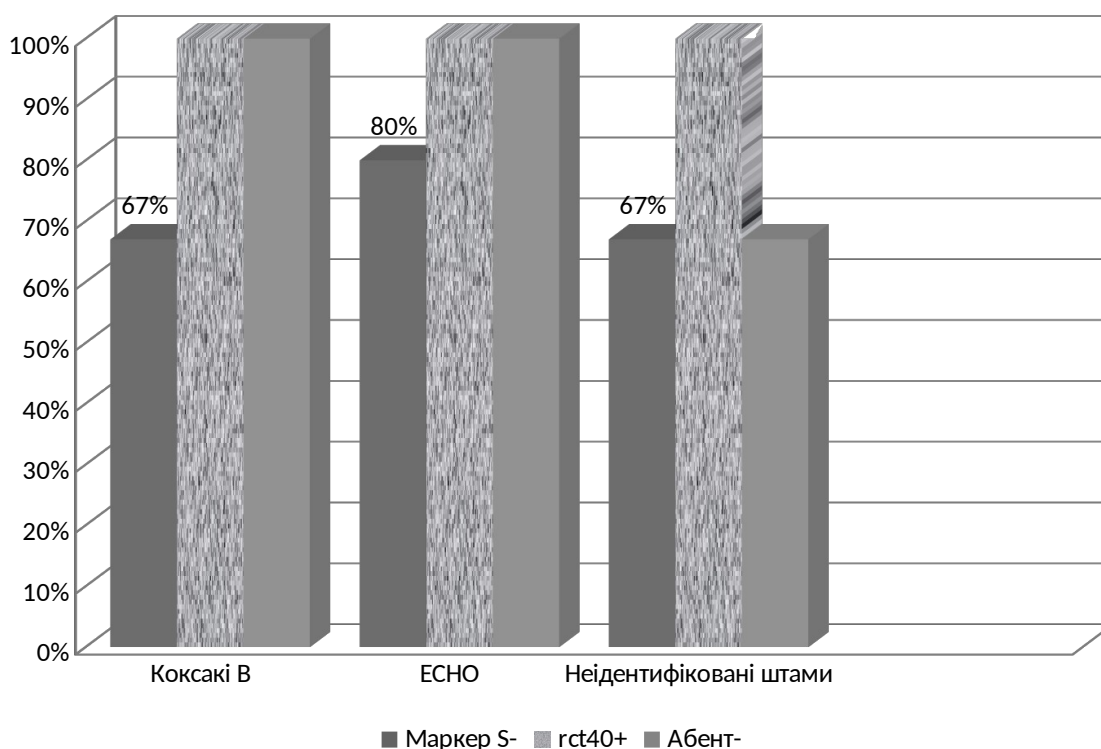


Рис. 3.7. Генетичні маркери ентеровірусів, виділених із сироватки крові хворих з ГПМК

На думку дослідників, найбільшу кореляцію з вірулентністю ентеровірусів має маркер rct_{40} , дещо меншу – бентонітовий маркер та маркер S [19, 24].

Розподіл генетичних маркерів вірулентності ентеровірусів, виділених із сироватки крові хворих з ГПМК

Віруси	Кількість штамів	Кількість штамів з маркерами вірулентності		
		rct ₄₀ ⁺	A _{бент} ⁻	S-
Коксакі В	3	3	3	2
ЕCHO	5	5	5	4
Неідентифіковані і штами вірусів	3	3	2	2
Всього	11	11	10	8

За нашими даними, у досліджених ізолятах ентеровірусів найчастіше було виявлено маркер rct₄₀⁺ (усі 11 ізолятів), на другому місці був бентонітовий маркер A_{бент}⁻ (10 з 11 ізолятів) та прояв маркеру S- (8 з 11 ізолятів).

На підставі отриманих результатів можемо зробити висновок про фенотипові характеристики виділених нами штамів ентеровірусів за генетичними маркерами rct₄₀⁺, A_{бент}⁻ та S-. Отже, для штамів ентеровірусів, асоційованих з ГПМК, властиві наступні характеристики: здатність до репродукції при температурі 40 °С (позитивний маркер rct₄₀⁺), низький афінитет до бентоніту (маркер A_{бент}⁻) та утворення дрібних бляшок під бентонітовим покриттям (маркер S-). Це дозволяє рекомендувати визначення генетичних маркерів для внутрішньотипової диференціації ентеровірусів, виділених із сироваток крові хворих з ГПМК.

3.5 Визначення специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів у сироватках крові хворих на гостре порушення мозкового кровообігу за допомогою імуноферментного аналізу

Для визначення антитіл до ентеровірусів класів Ig M та Ig G у сироватках крові хворих з ГПМК було використано імуноферментний аналіз (ІФА). Вказане дослідження є високочутливим та високоспецифічним, однак

досі відсутні універсальні панелі, які б включали діагностикуми всіх відомих ентеровірусів на сьогодні.

Окрім високої чутливості та специфічності, метод має також перевагу у тому, що дозволяє за динамікою синтезу антитіл визначити період захворювання. За допомогою цього методу досліджуються парні сироватки (перша сироватка крові забирається на початку хвороби, друга – через 10-14 днів після першої сироватки).

У сироватках крові 10 хворих (13,9%) із 72 осіб основної групи було виявлено специфічні Ig M до ентеровірусів (табл. 3.5). Водночас, у жодного пацієнта з групи порівняння не було виявлено Ig M до ентеровірусів.

Таблиця 3.5

Дослідження парних сироваток крові хворих основної групи на наявність Ig M до ентеровірусів за допомогою ІФА (позитивні результати дослідження)

№ п/п	Шифр хворого згідно журналу реєстрації	Вміст Ig M у 1-й сироватці крові хворих		Вміст Ig M у 2-й сироватці крові хворих	
		Абсолютні значення*	Інтерпретація результату	Абсолютні значення*	Інтерпретація результату
1	28	6,4	–	15,5	+
2	34	11,3	+	18,0	+
3	38	11,9	+	16,6	+
4	39	10,7	±	12,1	+
5	42	4,1	–	11,9	+
6	49	6,8	–	15,7	+
7	52	10,4	±	13,2	+

Продовження таблиці 3.5

№ п/п	Шифр хворого згідно журналу реєстрації	Вміст Ig M у 1-й сироватці крові хворих		Вміст Ig M у 2-й сироватці крові хворих	
		Абсолютні значення*	Інтерпретація результату	Абсолютні значення*	Інтерпретація результату
8	69	2,1	–	11,7	+
9	91	15,2	+	18,5	+
10	95	9,1	±	13,3	+

* Референтні значення, надані виробником тест-системи: менше 9,0 – негативний результат (–), 9,0-11,0 – сумнівний (±), більше 11,0 – позитивний результат (+). Обчислювали дані за формулою, наданою в інструкції виробника (розділ 2.2.3).

У 4 хворих у першій сироватці Ig M до ентеровірусів виявлено не було, у 3 хворих результат на виявлення Ig M до ентеровірусів був сумнівним, але у другій сироватці крові цих хворих були виявлені Ig M до ентеровірусів (позитивний результат). У інших трьох хворих Ig M до ентеровірусів були виявлені у обох взятих сироватках крові. Отже, виявлення специфічних Ig M до ентеровірусів у сироватках крові хворих з ГПМК є ознакою гострої ентеровірусної інфекції або ж загострення хронічної ентеровірусної інфекції.

Для з'ясування питання щодо гострої чи хронічної ентеровірусної інфекції нами було визначено Ig G до ентеровірусів у сироватках крові хворих з ГПМК та проведення порівняльного аналізу. У основній групі Ig G до ентеровірусів були виявлені в сироватках крові у 17 хворих (23,6±5,9%), як показано у таблиці 3.6. У решти хворих основної групи (55 осіб) Ig G у діагностичному титрі виявлено не було. Аналіз отриманих даних, представлених у таблиці 3.5, демонструє, що у 5 із 17 хворих були відсутні Ig G у першій сироватці, однак з'явилися у другій сироватці у діагностичному титрі. У 3 осіб у першій сироватці крові результат щодо виявлення Ig G був сумнівним, натомість у другій сироватці – позитивним.

У 9 осіб основної групи хворих Ig G виявлялись у діагностичних титрах як у першій, так і у другій сироватках.

Таблиця 3.6.

Дослідження парних сироваток крові хворих основної групи на наявність IgG до ентеровірусів за допомогою ІФА (позитивні результати дослідження)

№ п/п	Шифр хворого згідно журналу реєстрації	1-ша сироватка крові хворого		2-а сироватка крові хворого	
		Абсолютні значення*	Інтерпретація результату	Абсолютні значення*	Інтерпретація результату
1	2	3	4	5	6
1	11	9,1	±	13,0	+
2	17	10,1	±	12,1	+
3	38	13,8	+	20,5	+
4	41	12,6	+	18,2	+
5	42	10,9	±	12,6	+
6	47	17,9	+	16,9	+
7	48	14,6	+	14,1	+
8	51	13,9	+	14,8	+
9	52	17,6	+	19,9	+
10	67	1,6	–	14,8	+
11	72	15,4	+	15,1	+
12	74	14,5	+	18,3	+
13	79	1,9	–	14,2	+
14	94	1,7	–	14,6	+
15	95	8,9	–	17,2	+

Продовження таблиці 3.6

1	2	3	4	5	6
16	98	11,9	+	15,2	+
17	99	2,7	–	13,4	+

* Референтні значення, надані виробником тест-системи: менше 9,0 – негативний результат (–), 9,0-11,0 – сумнівний (±), більше 11,0 – позитивний

результат (+). Обчислювали дані за формулою, наданою в інструкції виробника (розділ 2.2.3).

На рисунку 3.8. представлена частота виявлення специфічних Ig G до ентеровірусів у парних сироватках крові хворих з ГПМК.

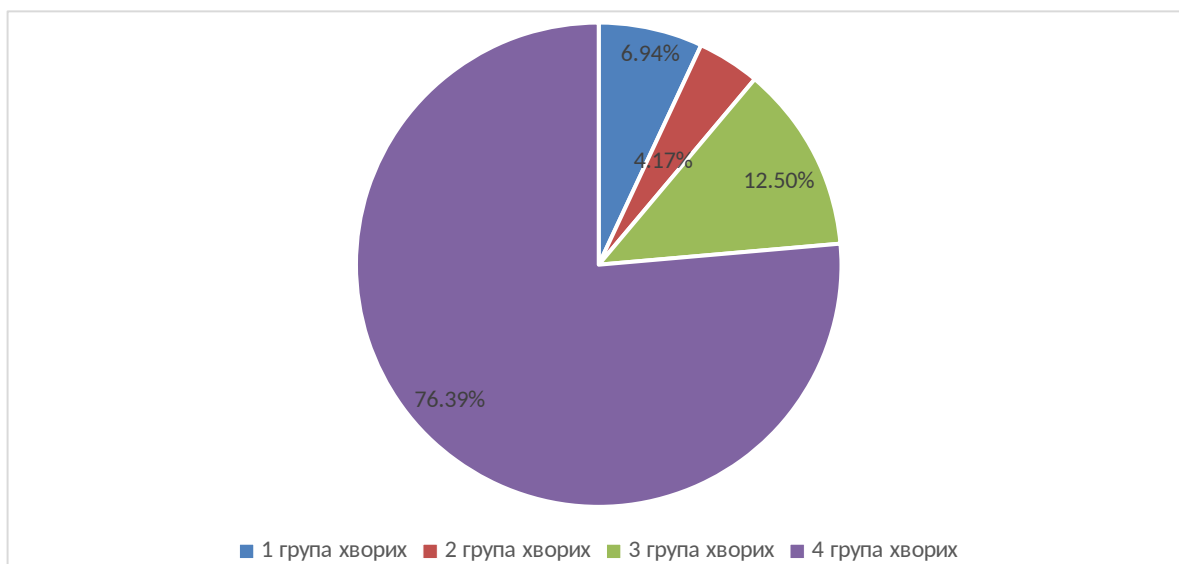


Рис. 3.8. Частота виявлення специфічних Ig G до ентеровірусів у парних сироватках крові хворих з ГПМК (основна група): 1 група хворих – хворі, у яких відсутні Ig G у першій сироватці, але присутні у другій сироватці у діагностичному титрі; 2 група хворих – хворі, у яких результат щодо виявлення Ig G у першій сироватці крові сумнівний, у другій сироватці – позитивний; 3 група хворих – хворі, у яких Ig G виявлялись у діагностичних титрах у обох сироватках; 4 група хворих – хворі, у яких Ig G не виявлялись у обох сироватках.

При проведенні дослідження парних сироваток крові хворих групи порівняння на наявність Ig G до ентеровірусів за допомогою ІФА було визначено Ig G у діагностичному титрі лише у 2 з 35 осіб (5,7%). У одного з них у першій сироватці результат був сумнівний, проте у другій – позитивний, тоді як у другого хворого у обох сироватках результат щодо наявності Ig G у діагностичних титрах був позитивний (табл. 3.7).

Таблиця 3.7.

Дослідження парних сироваток крові хворих групи порівняння на наявність специфічних Ig G до ентеровірусів за допомогою ІФА (позитивні результати дослідження)

№ п/п	Шифр хворого згідно журналу реєстрації	Виявлення Ig G у 1-й сироватці крові хворих		Виявлення Ig G у 2-й сироватці крові хворих	
		Абсолютні значення*	Інтерпретація результату	Абсолютні значення*	Інтерпретація результату
1	102	10,9	±	14,1	+
2	130	12,1	+	12,3	+

* Референтні значення, надані виробником тест-системи: менше 9,0 – негативний результат (-), 9,0-11,0 – сумнівний (±), більше 11,0 – позитивний результат (+). Обчислювали дані за формулою, наданою в інструкції виробника (розділ 2.2.3).

При порівнянні частоти виявлення Ig G у парних сироватках крові хворих основної групи та групи порівняння, звертає на себе увагу значно більша частка серопозитивних за Ig G хворих основної групи – 23,6%, тоді як у групі порівняння частка серопозитивних за Ig G хворих склала 5,7%, ($p < 0,05$).

Порівняльні результати вірусологічного та серологічного дослідження у основної групи хворих представлені у таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

Порівняння результатів вірусологічного та серологічного дослідження у основної групи хворих

Результати серологічного дослідження	Результати вірусологічного дослідження у основної групи хворих		Разом хворих основної групи
	Виділено ентеровіруси	Не виділено ентеровіруси	

	абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)
Серопозитивні хворі за Ig G	5	6,9±3,0	12	16,7±4,4	17	23,6±5,9
Серонегативні хворі за Ig G	6	8,3±3,3	49	68,1±5,5	55	76,4±5,9
Разом	11	15,3±4,2	61	84,7±4,2	72	100

Як видно з таблиці, у 5 із 72 осіб основної групи було виділено ентеровіруси за допомогою вірусологічного методу дослідження та визначено Ig G у діагностичному титрі, що підтверджує наявність у них хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції.

При порівняння результатів серологічного та молекулярно-генетичного методів дослідження виявилось, що Ig G до ентеровірусів присутні у 8 із 17 осіб, у яких в сироватках крові було виявлено геном ентеровірусів (табл. 3.9). Виявлення у сироватках крові у 8 із 72 хворих основної групи геномів ентеровірусів та специфічних Ig G до них (11,1±3,7%) може свідчити про персистуючий характер ентеровірусної інфекції [123].

Звертає на себе увагу, що у 9 із 72 хворих основної групи у сироватках крові було виявлено специфічні Ig G до ентеровірусів, хоча ентеровіруси в сироватці крові цих хворих не були виявлені за допомогою вірусологічного та молекулярно-генетичного методів, що може свідчити про перенесену або хронічну персистуючу ентеровірусну інфекцію.

Таблиця 3.9

Результати молекулярно-генетичного та серологічного дослідження на виявлення специфічних Ig G до ентеровірусів у хворих основної групи

Результати серологічного дослідження (за	Результати молекулярно-генетичного дослідження		Разом хворих основної групи
	ПЛР +	ПЛР –	

Ig G)	абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)
Серопозитивні за Ig G	8	11,1±3,7	9	12,5±3,9	17	23,6±5,9
Серонегативні за Ig G	9	12,5±3,9	46	63,9±5,7	55	76,4±5,9
Разом	17	23,6±5,9	55	76,4±5,9	72	100

За результатами наших досліджень було виявлено, що частка серопозитивних хворих, у сироватках крові яких ентеровіруси та їх геноми не виявлялись, була достовірно вищою у основній групі (12,5±3,9%), ніж у групі порівняння (5,7±3,9%), ($p < 0,05$).

У сироватках крові хворих групи порівняння специфічні Ig G до ентеровірусів було виявлено лише у 2 осіб (5,7±3,9%), що були ПЛР-негативними, тоді як специфічні Ig M до ентеровірусів виявлено не було. Результати молекулярно-генетичного та серологічного дослідження на виявлення специфічних Ig G до ентеровірусів у хворих групи порівняння представлено у таблиці 3.10.

Таблиця 3.10

Результати молекулярно-генетичного та серологічного дослідження на виявлення специфічних Ig G до ентеровірусів у хворих групи порівняння

Результати серологічного дослідження на виявлення Ig G	Результати молекулярно-генетичного дослідження				Разом пацієнтів групи порівняння	
	ПЛР +		ПЛР –		абс.	% (M±m)
	абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)		
Серопозитивні	0	0	2	5,7±3,9	2	5,7±3,9

за Ig G						
Серонегативні	1	2,9±2,8	32	91,4±4,7	33	94,3±3,9
за Ig G						
Разом	1	2,9±2,8	34	97,1±2,8	35	100

Співставлення результатів молекулярно-генетичного, вірусологічного та серологічного методів дослідження у ПЛР-позитивних хворих основної групи представлено у таблиці 3.11. При аналізі даних згаданої таблиці звертає на себе увагу, що у 2 ПЛР-позитивних хворих було виділено вірус та виявлено Ig M та Ig G у сироватках крові.

У 2 ПЛР-позитивних хворих вірус не було виділено, але були Ig M та Ig G у сироватках крові хворих. Виявлення Ig M та Ig G водночас у обох сироватках крові хворих дає підстави говорити про можливу наявність персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення.

У 3 ПЛР-позитивних хворих було виділено вірус та виявлено лише Ig G за відсутності Ig M у сироватках крові хворих. У 1 ПЛР-позитивного хворого не було виділено вірус, та виявлено лише Ig G за відсутності Ig M у сироватці крові. Відсутність Ig M та наявність Ig G у сироватках крові цих чотирьох хворих, вірогідно, свідчить про наявність у них хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції.

У 6 ПЛР-позитивних хворих було виділено вірус та виявлено лише Ig M за відсутності Ig G у сироватках крові хворих, що дає підстави припускати наявність у них гострої ентеровірусної інфекції.

У 3 ПЛР-позитивних хворих вірус не було виділено та не виявлено ані Ig M, ані Ig G у сироватках крові хворих, що можна розцінити як наявність персистуючої ентеровірусної інфекції.

Таблиця 3.11

**Співставлення результатів молекулярно-генетичного,
вірусологічного та серологічного методів дослідження
у ПЛР-позитивних хворих основної групи**

№п/п	Шифр хворого згідно журналу реєстрації	ПЦР	Виділення вірусу	Ig M		Ig G	
				1-а	2-а	1-а	2-а
1	2	3	4	5	6	7	8
1	17	+	+	–	–	±	+ ↑
2	28	+	+	–	+ ↑	–	–
3	34	+	+	+	+	–	–
4	38	+	+	+	+	+	+
5	39	+	+	±	+ ↑	–	–
6	41	+	+	–	–	+	+
7	42	+	–	–	+ ↑	±	+ ↑
8	47	+	+	–	–	+	+
9	49	+	+	–	+ ↑	–	–
10	51	+	–	–	–	+	+
11	52	+	+	±	+ ↑	+	+

Продовження таблиці 3.11

1	2	3	4	5	6	7	8
12	54	+	–	–	–	–	–
13	63	+	–	–	–	–	–
14	66	+	–	–	–	–	–
15	69	+	+	–	+ ↑	–	–
16	91	+	+	+	+	–	–
17	95	+	–	±	+ ↑	–	+ ↑
Всього		17	11	3	10	5	8

Отже, нами було визначено наявність лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції у 26 хворих (36,1%) із 72 хворих основної групи, а саме: у 6 хворих були виявлені лабораторні маркери гострої ентеровірусної інфекції (за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виявлено ентеровіруси у сироватках крові, та було виявлено специфічний Ig M); у 8 хворих були виявлені лабораторні маркери хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення (за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виділено ентеровіруси у сироватках крові, та в

ІФА визначені специфічні Ig G або одночасно Ig M та Ig G); у 9 хворих були виявлені лабораторні маркери перенесеної ентеровірусної інфекції (за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу не було виявлено ентеровірусів у сироватках крові, але виявлено специфічні Ig G в ІФА); у 3 хворих було виявлено лабораторні маркери персистоючої ентеровірусної інфекції (за результатами ПЛР було виявлено РНК ентеровірусів у сироватках крові, але специфічних Ig M та Ig G виявлено не було). У 46 хворих основної групи не було виявлено лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції.

Лабораторні маркери ентеровірусної інфекції були виявлені лише у 3 осіб (8,6%) з 35 осіб групи порівняння, з яких 1 особа була ПЛР-позитивна, і у двох осіб було виявлено лише специфічні Ig G до ентеровірусів.

На нашу думку, це свідчить про можливу тригерну роль як гострої, так і хронічної персистоючої ентеровірусної інфекції у патогенезі ГПМК.

Висновки до розділу 3.

1. Вперше доведено, що із сироваток крові хворих з ГПМК геноми ентеровірусів виділяються достовірно частіше, ніж у пацієнтів групи порівняння ($23,6 \pm 5,9\%$ та $2,9 \pm 2,8\%$ відповідно, $p < 0,05$).
2. Показано, що у 17 ПЛР-позитивних сироватках крові хворих основної групи у 11 випадках ізольовано вірусні агенти, які ідентифіковано як віруси Коксакі В (серотипи 2, 3, 4), віруси ЕСНО (серотипи 6, 9, 27 (два штами), 29) та три неідентифікованих штами вірусів.
3. Встановлено, що досліджені ізоляти ентеровірусів характеризуються певними генетичними характеристиками: в усіх 11 ізолятів виявлено маркер gct_{40}^+ , у 10 з 11 ізолятів – бентонітовий маркер $A_{\text{бент}}^-$, прояв маркеру S– мали 8 з 11 ізолятів. Ці спільні ознаки можуть розглядатись як допоміжні при вивченні ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК.
4. На підставі вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень показано, що лабораторні маркери ентеровірусної інфекції були виявлені у 26 хворих (36,1%) із 72 хворих з ГПМК (основна група), а

саме: у 6 хворих (перша підгрупа) були виявлені лабораторні маркери гострої ентеровірусної інфекції (виявлено ентеровіруси та/або їх геном та специфічні Ig M у сироватках крові); у 8 хворих були виявлені лабораторні маркери хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення (виявлено ентеровіруси та/або їх геном та специфічні Ig G або Ig M та Ig G у сироватках крові); у 9 хворих (третя підгрупа) були виявлені лабораторні маркери перенесеної ентеровірусної інфекції (не виявлено ентеровірусів у сироватках крові, але виявлено специфічні Ig G до ентеровірусів); у 3 хворих (четверта підгрупа) було виявлено лабораторні маркери персистуючої ентеровірусної інфекції (виявлено РНК ентеровірусів у сироватках крові, але специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів не виявлено). У 46 хворих (п'ята підгрупа) не було виявлено лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції. Лабораторні маркери ентеровірусної інфекції були виявлені лише у 3 осіб (8,6%) з 35 осіб групи порівняння, з яких 1 особа була ПЛР-позитивна, і у двох осіб було виявлено лише специфічні Ig G до ентеровірусів.

5. Для діагностики гострої та хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК рекомендовано поєднання ПЛР для виявлення геномів ентеровірусів та ІФА для виявлення специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів. Застосування вірусологічного методу діагностики з вивченням генетичних маркерів дозволяє проводити типову і внутрішньотипову диференціацію виділених штамів ентеровірусів, асоційованих з ГПМК.

Результати досліджень, представлені у даному розділі, викладені в наступних друкованих працях:

1. The role of the persistent enterovirus infection in development of acute stroke / Andriushkova N.G. et al. // *Wiadomosci Lekarskie*. 2017. T. LXX, № 2. P. 187—191.
2. Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С., Долинчук Л.В. Роль энтеровирусной инфекции в возникновении острого нарушения мозгового

- кровообращения // Современные исследования медико-биологических наук. Москва, 2014. С. 35—40.
3. Дослідження генома ентеровірусів у сироватці крові хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Український неврологічний журнал. 2016. № 3. С. 8—12.
 4. Геном ентеровірусів у сироватці крові хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медичні перспективи. 2016. Т. XXI, № 4. С. 33—38.
 5. Персистуюча ентеровірусна інфекція у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медична наука України. 2016. № 4. С. 51—55.
 6. Пат. 93020 UA. МПК А61В 5/00 (2014.01) Спосіб діагностики ентеровірусної інфекції у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Н.С. Турчина, Н.Г. Андрюшкова; заявник та патентовласник Національний медичний університет імені О.О. Богомольця. - № и 2014 04634; заявл. 30.04.2014 ; опубл. 10.09.2014, Бюл. № 17.
 7. Андрюшкова Н.Г. Ентеровірусна інфекція як імовірна причина гострого порушення мозкового кровообігу // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції “Роль та місце медицини у забезпеченні здоров’я людини у сучасному суспільстві”, 27 грудня 2013 року. Одеса, 2013. С. 161—163.
 8. Энтеровирусная инфекция, как возможный фактор риска развития острого нарушения мозгового кровообращения / Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С., Унич П.П., Трепет Л.Н. // Матеріали XIV міжнародної наукової конференції “Формування національних і загальнолюдських цінностей у студентів медичних і фармацевтичних вищих навчальних закладів”, 26 березня 2014 року. Київ, 2014. С. 18—22.
 9. Андрюшкова Н.Г. Застосування полімеразно-ланцюгової реакції для визначення етіологічної ролі ентеровірусної інфекції у хворих на гостре

порушення мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С. // Матеріали VI Конгресу Південно-Східно Європейського Медичного Форуму та XIV з'їзду Всеукраїнського лікарського товариства, 8-15 вересня 2015 р. Одеса, 2015. С. 336.

10. Кореляція між ентеровірусною інфекцією та гострим порушенням мозкового кровообігу на підставі вірусологічного, молекулярно-генетичного та серологічного методів дослідження / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медична наука України. 2017. № 3—4. С. 38—45.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ КЛІНІКО-ЛАБОРАТОРНИХ ДАНИХ ХВОРИХ З ГОСТРИМ ПОРУШЕННЯМ МОЗКОВОГО КРОВООБІГУ ТА ЛАБОРАТОРНИМИ МАРКЕРАМИ ЕНТЕРОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

На підставі результатів вірусологічного, молекулярно-генетичного та серологічного досліджень основну групу хворих з ГПМК (72 особи) було поділено на наступні підгрупи за лабораторними маркерами наявності ентеровірусної інфекції (рис. 4.1).

До першої підгрупи увійшли 6 хворих з ГПМК з лабораторними маркерами гострої ентеровірусної інфекції, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виявлено ентеровіруси у сироватках крові, та було виявлено лише Ig M.

До другої підгрупи увійшли хворі з ГПМК з лабораторними маркерами хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виділено ентеровіруси у сироватках крові, та в ІФА визначені лише Ig G до них (4 особи) або Ig M та Ig G до них (4 особи), всього 8 осіб.

До третьої підгрупи увійшли 9 хворих з ГПМК з лабораторними маркерами перенесеної ентеровірусної інфекції, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу не було виявлено ентеровірусів у сироватках крові, однак було виявлено Ig G в ІФА (серопозитивні за Ig G хворі).

До четвертої підгрупи увійшли 3 хворих з ГПМК з лабораторними маркерами персистуючої ентеровірусної інфекції, у сироватках крові яких за результатами ПЛР було виявлено РНК ентеровірусів, але Ig M та Ig G до них виявлено не було.

До п'ятої підгрупи увійшли хворі з ГПМК, у яких не було виявлено лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції (серонегативні за Ig M та Ig G хворі), всього 46 осіб.

Хворі з гострим порушенням мозкового кровообігу (основна група)



Рис. 4.1. Розподіл хворих з ГПМК (основна група) на підгрупи: I підгрупа – хворі з лабораторними маркерами гострої ентеровірусної інфекції, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виявлено ентеровіруси у сироватках крові та було виявлено лише Ig M; II підгрупа – хворі з

лабораторними маркерами хронічної персистоючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виділено ентеровіруси у сироватках крові та в ІФА визначені лише Ig G до них або Ig M та Ig G до них; III підгрупа – хворі з лабораторними маркерами перенесеної ентеровірусної інфекції, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу не було виявлено ентеровірусів у сироватках крові, однак було виявлено Ig G в ІФА; IV підгрупа – хворі з лабораторними маркерами персистоючої ентеровірусної інфекції, у яких за результатами ПЛР було виявлено РНК ентеровірусів у сироватках крові, але специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів не виявлено; V підгрупа – хворі, у яких не було виявлено лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції (серонегативні за Ig M та Ig G хворі).

Для оцінки впливу наявної ентеровірусної інфекції на перебіг захворювання та оцінку етіопатогенетичної ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК нами було проаналізовано клініко-лабораторні дані хворих кожної з підгруп (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Порівняльна характеристика клінічного стану хворих основної групи з ознаками ентеровірусної інфекції та без них

Критерії оцінювання	Основна група (n=72)					
	1	2	3	4	5	Разом
	підгрупа	підгрупа	підгрупа	підгрупа	підгрупа	(n=72)
	(n=6)	(n=8)	(n=9)	(n=3)	(n=46)	
	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)
	M± m	M± m	M± m	M± m	M± m	M± m
1	2	3	4	5	6	7
Вік хворих, роки	62,1±8,6	53,9±7,7	65,6±8,4	69,7±11,8	63,8±10,5	63,0±13,0
Стать: чоловіча, %	2 (33,3%)	2 (25,0%)	3 (33,3%)	1 (33,3%)	23 (50%)	31 (43,1%)

Жіноча, %	4 (66,7%)	6 (75,0%)	6 (66,7%)	2 (66,7%)	23 (50%)	41 (56,9%)
Тяжкість при госпіталізації, бали*	7,7±2,4	5,6±7,1	8,0±2,0	7,0±2,7	7,5±2,6	7,3±3,0
Тяжкість через 1 тиждень, бали*	6,0±3,9	2,5±2,1	5,1±3,0	5,3±2,2	4,8±3,1	4,6±3,6

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4	5	6	7
ГРВІ в анамнезі за 1-14 днів до ГПМК	5 (83,36%)	8 (100%)	5 (55,6%)	1 (33,3%)	22 (47,8%)	41 (56,9%)
Холестерин, ммоль/л	6,1±1,9	5,7±0,9	4,8±0,8	4,3±0,2	5,2±6,2	5,3±1,0
Паління, кількість осіб	1 (16,7%)	1 (12,0%)	1 (11,1%)	0 (0%)	13 (28,3%)	16 (22,2%)
Зловживання алкоголем, кількість осіб	1 (16,7%)	1 (12,0%)	1 (11,1%)	0 (0%)	8 (17,4%)	11 (15,2%)
Гіпертонічна хвороба, кількість осіб	6 (100%)	7 (87,5%)	9 (100%)	3 (100%)	38 (82,6%)	63 (87,5%)
Надлишкова	1	0	0	0	10	11

вага, кількість осіб	(16,7%)	(0%)	(0%)	(0%)	(21,7%)	(15,3%)
Смерть як наслідок ГПМК, кількість осіб	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	3 (6,5%)	4 (5,6%)
Рецидив ГПМК до/після, кількість осіб	3 (50%)	2 (25%)	3 (33,3%)	1 (33,3%)	14 (30,4%)	23 (31,9%)

Примітка: * – за шкалою тяжкості інсульту Національних інститутів здоров'я США (NIHSS)

Вік хворих основної групи коливався від 31 року до 86 років, і в середньому склав $63,0 \pm 13,0$ років. Звертає на себе увагу молодший вік хворих другої підгрупи з лабораторними маркерами персистуючої ентеровірусної інфекції (ПЛР+ та серопозитивні за специфічними Ig M та/або Ig G), який становив $53,9 \pm 7,7$ роки, тоді як у хворих четвертої підгрупи (ПЛР+ та серонегативні за Ig M та Ig G) становив $69,7 \pm 11,8$ років. Можливо, саме літній вік хворих четвертої підгрупи пояснює виявлення геному ентеровірусів за відсутності специфічних Ig M та Ig G, що може бути пов'язано з низькою імунною реактивністю організму цих хворих.

Серед хворих основної групи більшість становили жінки – 41 (56,9%), тоді як чоловіків було 31 особа (43,1%). Достовірних відмінностей між статтю хворих у групах виявлено не було. Аналізуючи тяжкість перебігу ГПМК хворих основної групи при госпіталізації та через тиждень, було виявлено, що у другій підгрупі хворих вона становила $5,5 \pm 1,7$ та $2,5 \pm 2,1$ балів відповідно, що достовірно нижче ($p < 0,05$), ніж у інших підгрупах. Для встановлення наявності чи відсутності зв'язку між ентеровірусною інфекцією та тяжкістю і

особливостями клінічного перебігу ГПМК вважаємо доцільним у подальшому провести дослідження на більшій вибірці хворих.

Як підтверджено рядом досліджень, перебіг ентеровірусних інфекцій можливий як з клінічними проявами у вигляді застудних захворювань, гострої респіраторної вірусної інфекції (ГРВІ), шлунково-кишкових розладів, так і безсимптомний [154, 173, 220]. При цьому один і той самий серотип ентеровірусу може спричинити різні клінічні форми ентеровірусної інфекції, що зумовлено поліорганним тропізмом цих вірусів [57, 174, 227, 269]. При аналізі анамнестичних даних було відмічено, що ГРВІ в анамнезі за 1-14 днів (упродовж двох тижнів) до госпіталізації з приводу ГПМК була у 41 із 72 хворих основної групи (56,9%). При аналізі цих показників по підгрупах виявилось, що у 100% хворих другої підгрупи та у 83,3% хворих першої підгрупи в анамнезі були симптоми ГРВІ. Натомість, у хворих третьої, четвертої та п'ятої підгруп симптоми ГРВІ в анамнезі були 55,6%, 33,3% та 47,8% відповідно. Це може пояснювати появу у сироватках крові хворих ентеровірусів та антитіл до них. Рівень холестерину у хворих основної групи становив $5,3 \pm 1,0\%$, тоді як достовірної різниці між цими показниками у групі виявлено не було.

За нашими результатами, істотних відмінностей між підгрупами хворих за даними щодо паління, зловживання алкоголем чи наявністю у хворих гіпертонічної хвороби не було виявлено. Летальний наслідок після перенесеного ГПМК мав місце у 4 із 72 хворих основної групи (5,6%). Впродовж одного року після перенесеного ГПМК рецидив відбувся у 20 хворих (27,8%). При цьому слід зауважити, що серед хворих другої підгрупи жодного випадку рецидиву ГПМК не було, тоді як найбільший відсоток рецидивів було виявлено серед хворих п'ятої підгрупи, у яких не було виявлено лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції. Водночас, слід зауважити, що для подальшої вагомої аргументації слід залучити більшу кількість хворих до наукового дослідження.

У зв'язку з отриманими даними можна припустити, що наявна ентеровірусна інфекція, як гостра, так і хронічна персистуюча, може провокувати ГПМК у хворих молодшого віку навіть за відсутності інших факторів ризику.

Нами було здійснено порівняльний аналіз клінічного стану хворих з ГПМК з відповідними показниками у групі порівняння (таблиця 4.2).

Група порівняння включала 35 осіб віком від 18 до 88 років, середній вік становив $56,4 \pm 19,3$ роки. До вибірки увійшли 22 жінки (62,9%) і 13 чоловіків (37,1%). Аналіз отриманих даних дозволив стверджувати про відсутність значущої різниці між даними щодо частки осіб, що палять, у основній групі та групі порівняння. Водночас, за нашими даними, частка осіб, що зловживають алкоголем, у основній групі є вищою, ніж у групі порівняння ($p > 0,05$). Водночас, у 63 із 72 хворих (87,5%) в основній групі було діагностовано гіпертонічну хворобу (показники артеріального тиску більше 140/90 мм рт ст), тоді як у групі порівняння лише у 24 з 35 хворих (68,6%) було діагностовано гіпертонічну хворобу. Також слід звернути увагу, що 11 хворих (15,3%) у основній групі мали надлишкову вагу, тоді як у групі порівняння лише 1 особа з 35 пацієнтів (2,9%) мала надлишкову вагу. Звертає на себе увагу вищий рівень холестерину у крові хворих основної групи ($5,3 \pm 1,0$ ммоль/л), ніж у групі порівняння ($4,74 \pm 0,84$ ммоль/л), але ці розбіжності в показниках не були статистично значущими ($p > 0,05$).

Таблиця 4.2

Характеристика клінічного стану хворих з ГПМК з основної групи та групи порівняння

Критерії оцінювання	Основна група	Група порівняння	p
	(n=72)	(n=35)	
	Абс (%)	Абс (%)	
	M ± m	M ± m	
Вік хворих, роки	63,0 ± 13,0	56,4 ± 19,3	p > 0,05
Стать: чоловіча, %	31 (43,1%)	13 (37,1%)	p > 0,05
Жіноча, %	41 (56,3%)	22 (62,9%)	p > 0,05
Паління	16 (22,2%)	5 (14,3%)	p > 0,05

Зловживання алкоголем	11 (15,3%)	1 (2,9%)	p> 0,05
Гіпертонічна хвороба (артеріальний тиск більше 140/90 мм рт ст), кількість осіб	63 (87,5%)	24 (68,6%)	p> 0,05
Надлишкова вага, кількість осіб	11 (15,3%)	1 (2,9%)	p> 0,05
Холестерин, ммоль/л	5,3±1,0	4,74±0,8	p> 0,05

За даними літератури, існує взаємозв'язок між сезонним зростанням захворюваності на гострі респіраторні захворювання та випадками ГПМК. Результати когортних досліджень підтверджують весняно-осінню сезонну залежність як вірусної активності, так і активності атеросклеротичного процесу. За даними науковців, саме у березні та листопаді відбувається загострення судинних захворювань. Так, за даними А.С. Прилуцького та співавторів, виділення ентеровірусів із стічних вод співпадає з підвищенням рівня захворюваності на ентеровірусні інфекції в місцевості, де проводилося дослідження [104]. В.А. Понятовський також вказує на залежність частоти виділення ентеровірусів зі стічних вод міста Києва від сезону року, хоча зазначає, що повна кореляція між клінічними серотипами та серотипами, які виділяються із проб стічної води, відсутня [98].

За нашими даними, піки захворюваності на ГПМК серед пацієнтів основної групи припадали на квітень та жовтень-листопад. Звертає на себе увагу, що хворі з лабораторними маркерами ентеровірусної інфекції (виділення геному ентеровірусів з сироватки крові та/або виявлення Ig M та/або Ig G у діагностичних титрах) частіше хворіли з ГПМК також у жовтні, листопаді та квітні, що частково може пояснити весняно-осінню сезонність захворюваності на ГПМК (рис. 4.2).

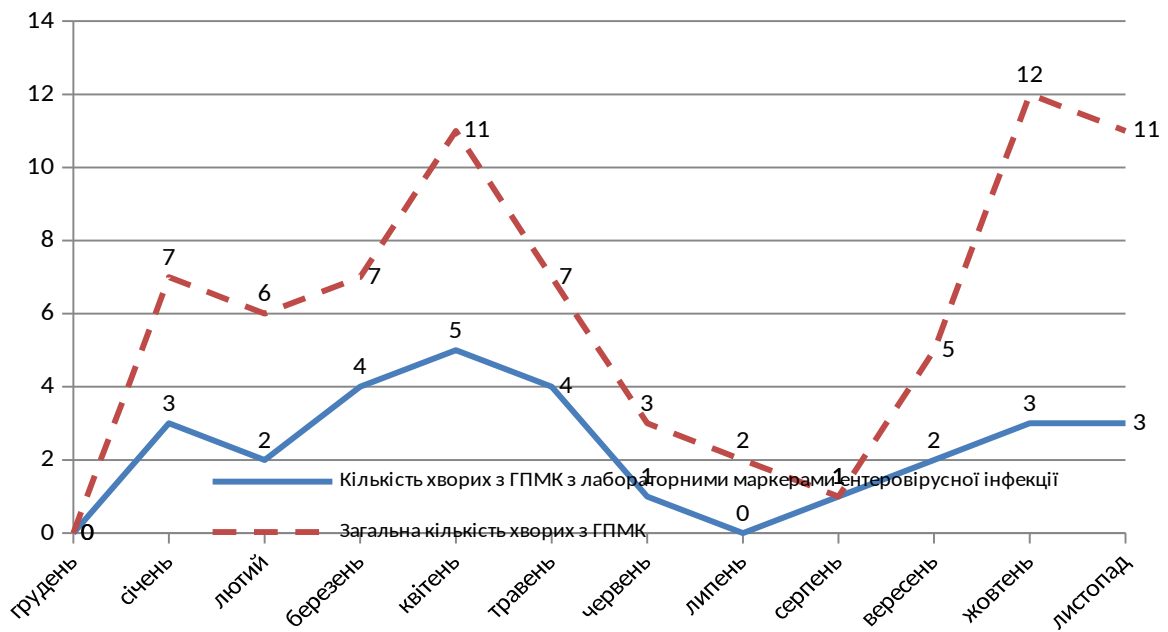


Рис. 4.2. Сезонні коливання кількості хворих з ГПМК з лабораторними маркерами ентеровірусної інфекції та загальної кількості хворих з ГПМК

Отримані дані дозволяють припустити, що як гостра, так і хронічна персистуюча ентеровірусна інфекція у хворих з ГПМК може бути тригерним фактором у розвитку ГПМК.

Висновки до розділу 4.

1. Встановлено, що персистуюча ентеровірусна інфекція може провокувати ГПМК у хворих молодшого віку навіть за відсутності інших факторів ризику. Показано, що середній вік хворих з лабораторними маркерами персистуючої ентеровірусної інфекції (ПЛР+ та серопозитивні за специфічними Ig M та/або Ig G) становив $53,9 \pm 7,7$ роки, а у хворих без лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції – $63,8 \pm 10,5$ роки.
2. Показано, що тяжкість перебігу ГПМК у хворих з лабораторними маркерами ентеровірусної інфекції (ПЛР-позитивних та серопозитивних за Ig M та Ig G) при госпіталізації та через тиждень становила $5,6 \pm 1,7$ та $2,5 \pm 2,1$ балів (за шкалою NIHSS) відповідно, що достовірно нижче ($p < 0,05$), ніж у інших підгрупах хворих основної групи.
3. Встановлено, що ГРВІ в анамнезі за 1-14 днів (впродовж двох тижнів) до госпіталізації з приводу ГПМК було у 41 хворих (56,9%) основної групи,

зокрема у 100% хворих другої підгрупи (ПЛР-позитивні та серопозитивні за Ig M та Ig G) та у 83,3% хворих першої підгрупи (ПЛР-позитивні та серопозитивні за Ig M), що з урахуванням здатності ентеровірусів викликати респіраторні захворювання, пояснює виявлення ентеровірусів з крові таких хворих у перший день госпіталізації. Натомість, у хворих третьої, четвертої та п'ятої підгрупи ГРВІ в анамнезі було лише у 55,6%, 33,3% та 47,8% відповідно ($p < 0,05$), що може слугувати підтвердженням ролі ентеровірусної інфекції як тригерного фактора у розвитку ГПМК.

4. При співставленні з групою порівняння, у основній групі хворих з ГПМК є вищою частка хворих, що зловживають алкоголем (15,3% та 2,9% відповідно), частка хворих з діагностованою гіпертонічною хворобою (87,5% та 68,6% відповідно) та частка хворих з надлишковою вагою (15,3% та 2,9% відповідно), що є факторами ризику при ГПМК. Хворі з основної групи мають вищий рівень холестерину у крові ($5,3 \pm 1,0$ ммоль/л та $4,74 \pm 0,84$ ммоль/л відповідно), аніж хворі у групі порівняння ($p > 0,05$).

5. Виявлено сезонність виділення ентеровірусів від хворих з ГПМК з піками у квітні та жовтні-листопаді.

Результати досліджень, представлені у даному розділі, викладені в наступних друкованих працях:

1. The role of the persistent enterovirus infection in development of acute stroke / Andriushkova N.G. et al. // Wiadomosci Lekarskie. 2017. T. LXX, № 2. P. 187—191.
2. Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С., Долинчук Л.В. Роль энтеровирусной инфекции в возникновении острого нарушения мозгового кровообращения // Современные исследования медико-биологических наук. Москва, 2014. С. 35—40.
3. Дослідження генома ентеровірусів у сироватці крові хворих з гострим порушенням мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Український неврологічний журнал. 2016. № 3. С. 8—12.

4. Генотип ентеровірусів у сироватці крові хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медичні перспективи. 2016. Т. XXI, № 4. С. 33—38.
5. Персистуюча ентеровірусна інфекція у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медична наука України. 2016. № 4. С. 51—55.
6. Пат. 93020 UA. МПК А61В 5/00 (2014.01) Спосіб діагностики ентеровірусної інфекції у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Н.С. Турчина, Н.Г. Андрюшкова; заявник та патентовласник Національний медичний університет імені О.О. Богомольця. — № u 2014 04634; заявл. 30.04.2014 ; опубл. 10.09.2014, Бюл. № 17.
7. Андрюшкова Н.Г. Ентеровірусна інфекція як імовірна причина гострого порушення мозкового кровообігу // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції “Роль та місце медицини у забезпеченні здоров’я людини у сучасному суспільстві”, 27 грудня 2013 року. Одеса, 2013. С. 161—163.
8. Энтеровирусная инфекция, как возможный фактор риска развития острого нарушения мозгового кровообращения / Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С., Унич П.П., Трепет Л.Н. // Матеріали XIV міжнародної наукової конференції “Формування національних і загальнолюдських цінностей у студентів медичних і фармацевтичних вищих навчальних закладів”, 26 березня 2014 року. Київ, 2014. С. 18—22.
9. Андрюшкова Н.Г. Застосування полімеразно-ланцюгової реакції для визначення етіологічної ролі ентеровірусної інфекції у хворих на гостре порушення мозкового кровообігу / Андрюшкова Н.Г., Турчина Н.С. // Матеріали VI Конгресу Південно-Східно Європейського Медичного Форуму та XIV з’їзду Всеукраїнського лікарського товариства, 8-15 вересня 2015 р. Одеса, 2015. С. 336.

10. Кореляція між ентеровірусною інфекцією та гострим порушенням мозкового кровообігу на підставі вірусологічного, молекулярно-генетичного та серологічного методів дослідження / Андрюшкова Н.Г. та ін. // Медична наука України. 2017. № 3—4. С. 38—45.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дисертаційна робота присвячена вивченню етіопатогенетичної ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК, що зумовлено актуальністю даної проблеми в Україні та світі.

В структурі серцево-судинної патології провідне місце належить гострим порушенням мозкового кровообігу, які уражають велику кількість населення у усіх країнах світу. Значна поширеність захворювань системи кровообігу у населення України зумовлює необхідність проведення досліджень щодо етіології, патогенезу, діагностики та профілактики ГПМК. Окрім відомих на даний час факторів ризику виникнення ГПМК, до яких належить атеросклеротичне ураження судин, захворювання серця, артеріальна гіпертонія, гіперліпопротеїнемія, спадковість, вік, стать, гіподинамія, зловживання палінням, алкоголем тощо, розглядається роль мікроорганізмів, зокрема, вірусних агентів [71, 117, 121, 122, 236].

В наш час з'ясовано безперечну етіопатогенетичну роль ентеровірусів при виникненні ряду соматичних патологій, а саме: неревматичних

захворювань серця (інфаркт міокарду, міокардит, перикардит, дилатаційна кардіоміопатія, атеросклероз, гострий коронарний синдром) [4, 26, 35, 41, 57, 66, 105, 137, 138]. Інтенсивна циркуляція ентеровірусів у різноманітних об'єктах навколишнього середовища, а також зміна домінуючих в циркуляції серотипів ентеровірусів підвищують ризик інфікування ними, а отже потребують більш глибокого вивчення ролі даних вірусів у етіопатогенезі серцево-судинної патології, зокрема, ГПМК [33, 41, 163, 188, 240, 275]. Особливу увагу слід звернути на легкість розповсюдження збудників, перш за все, водним шляхом як одним з основних у реалізації фекально-орального механізму передачі ентеровірусної інфекції, що разом з відсутністю специфічної профілактики ентеровірусних інфекцій (крім поліомієліту) сприяє розповсюдженню ентеровірусів серед населення [98, 99, 119].

Для вивчення тригерної ролі ентеровірусної інфекції у хворих на ГПМК з використанням бібліосемантичного методу було проведено аналіз наукових джерел щодо значення ентеровірусної інфекції у етіопатогенезі судинних захворювань, визначено присутність ентеровірусів та їх геному у сироватках хворих на ГПМК за допомогою вірусологічного методу та молекулярно-генетичного методу (ПЛР) дослідження, ідентифіковано ентеровіруси, виділені із сироватки крові хворих на ГПМК, за допомогою реакції віруснейтралізації, досліджено наявність специфічних Ig M та Ig G в парних сироватках з використанням серологічного методу діагностики (ІФА) у хворих на ГПМК та проведено порівняльний аналіз результатів дослідження у хворих на ГПМК та осіб групи порівняння для визначення етіопатогенетичної ролі даного вірусу при інсультах. Статистичну обробку отриманих даних проведено з використанням медико-статистичного методу за допомогою пакетів статистичних програм «Statistica 6,0 for Windows», EXCEL [5, 9].

При обранні методів визначення наявності ентеровірусної інфекції принциповим є вибір високочутливих та високоспецифічних методів. На даний час, згідно з методичними рекомендаціями з епідагляду та профілактики ентеровірусної (неполіомієлітної) інфекції, підставою для

лабораторного підтвердження ентеровірусної інфекції служить виявлення ентеровірусів або їх РНК в стерильних типах клінічного матеріалу із застосуванням прямих методів їх виявлення, або визначення сероконверсії, або чотириразового наростання титру антитіл при дослідженні парних сироваток, взятих з інтервалом в 14 днів [107].

Вірусологічний метод дозволяє виділити ентеровіруси на чутливих культурах клітин з подальшою ідентифікацією у реакції віруснейтралізації. Водночас, метод має ряд недоліків, до яких варто віднести наступні: значну тривалість виділення вірусів (2-4 тижні); часто низький титр віруса у клінічному матеріалі, що зумовлює невисоку ефективність ізоляції вірусів та потребу проводити пасажі віруса на культурі клітин для накопичення вірусу; неможливість виділення пошкоджених і нецитопатогенних віріонів, які не можуть проявляти цитопатичну дію на чутливих культурах клітин. Також не всі ентеровіруси можуть культивуватись на культурах клітин, що обмежує діагностичну здатність методу. Проведення ідентифікації ентеровірусів за допомогою реакції віруснейтралізації є досить коштовним та трудоемким. Водночас, даний метод є класичним та найбільш достовірним. Подальше молекулярно-генетичне дослідження виділених штамів ентеровірусів може дозволити провести ідентифікацію типу та субтипу ентеровірусів, диференціацію генотипу/субгенотипу, провести філогенетичний аналіз з метою моніторингу епідеміологічної ситуації [123].

Застосування молекулярно-генетичного методу дослідження (ПЛР) дозволяє визначити специфічні ділянки геному ентеровірусів, що робить цей метод високочутливим та високоспецифічним. Швидкість проведення дослідження (один робочий день) дозволяє рекомендувати даний метод як діагностичний у хворих на ентеровірусні інфекції.

Як вказують В.А. Анохін та ін., лабораторним підтвердженням діагнозу ентеровірусної інфекції є виявлення ентеровірусів або їх РНК в стерильних типах клінічного матеріалу; виявлення ентеровірусів або їх РНК в нестерильних типах матеріалу, за наявності етіологічно розшифрованого

спалаху ентеровірусної інфекції та типового клінічного перебігу захворювання або за відсутності спалаху та у відповідності їх серо- та генотипу специфічній клінічній картині захворювання; виявлення ентеровірусів або їх РНК у двох пробах нестерильних клінічних матеріалів різних типів [137].

За нашими даними, із сироваток крові хворих з ГПМК було виділено 11 вірусних агентів, які в реакції віруснейтралізації було ідентифіковано як віруси Коксаки В (серотипи 2, 3, 4), віруси ЕСНО (серотипи 6, 9, 27 (два штами), 29), тоді як три штами вірусу залишились неідентифікованими. При проведенні ПЛР для виявлення геному вірусів у сироватках крові хворих з ГПМК, позитивна реакція була із 17 зразками крові від хворих з основної групи та від однієї особи з групи порівняння. Отримані результати свідчать, по-перше, про вищу чутливість ПЛР для виявлення ентеровірусної інфекції, що дозволяє рекомендувати даний метод як діагностичний при підозрі на розвиток ГПМК на фоні ентеровірусної інфекції. По-друге, вища частка хворих з ГПМК, від яких було виділено ентеровіруси, є достовірно більшою, ніж пацієнтів з групи порівняння ($23,6 \pm 5,9\%$ та $2,9 \pm 2,8\%$ відповідно, $p < 0,05$). Таким чином, виявлення РНК ентеровірусів у сироватках крові обстежених хворих свідчить про наявність у них ентеровірусної інфекції. Отже, негативний результат вірусологічного методу діагностики ентеровірусної інфекції не виключає її наявність, оскільки циркуляція ентеровірусів у крові обмежується першими тижнями захворювання. Надалі підтвердження інфекції можливе шляхом проведення серодіагностики. Менша частота виявлення ентеровірусів культуральним методом за їх цитопатичною дією пояснюється тим, що не всі ентеровіруси можуть бути виділені на культурі клітин, а також низьким титром ентеровірусів у крові хворих [252].

З огляду на генетичні маркери вірулентності ентеровірусів, можна встановити їх внутрішньотипові відмінності, а також застосовувати ці маркери для визначення ступеня вірулентності як поліомієлітних, так і неполіомієлітних ентеровірусів в лабораторних умовах.

Найбільш уживаним для вивчення фенотипових характеристик виділених штамів ентеровірусів є наступні генетичні маркери: здатність розмножуватися у культурі клітин при температурі 40 °С (ознака t або маркер rst_{40}); ступінь афінітету вірусних часток до бентоніту ($A_{\text{бент}}$); розмір бляшок, які утворюють штами вірусів під бентонітовим чи агаровим покриттям (маркер S); репродукція вірусів за умови низької концентрації у поживному середовищі натрію гідрокарбонату (маркер d) [19, 30, 98].

Виділені нами з сироватки крові хворих з ГПМК ентеровіруси мали наступні генетичні маркери: 10 з 11 вірусів мали бентонітовий маркер $A_{\text{бент}}^-$ (90%), і лише один з неідентифікованих вірусів мав маркер $A_{\text{бент}}^+$.

Як вказувалося нами вище, бентонітовий маркер ($A_{\text{бент}}$), вперше виявлений та описаний В.П. Ширококовим, характеризує ступінь афінітету вірусних часток до бентоніту [126]. Було показано, що у популяції поліовірусів I типу найбільш вірулентним є варіант $A_{\text{бент}}^-$, у поліовірусів II і III типів – варіант $A_{\text{бент}}^+$, у той час як у популяції вірусів Коксаки вірулентним є варіант $A_{\text{бент}}^-$ [126]. Подальші дослідження виявили залежність афінітету до бентоніту від типу вірусів: високий афінітет до бентоніту мають поліовіруси усіх трьох типів (вакцинні штами), віруси Коксаки А7, А8, А18, Коксаки В3, В4, В6. Такі віруси як Коксаки А10, Коксаки В1 та В2 мають низький афінітет до бентоніту [61, 126]. Дисоціанти $A_{\text{бент}}^+$ та $A_{\text{бент}}^-$ різняться за своїми властивостями, а саме: вірулентністю, антигенністю та імуногенністю, певним органотропізмом та стійкістю у навколишньому середовищі [8, 11, 61, 64, 65, 66, 77, 110, 124, 129, 130]. Високовірулентні та імуногенні штами ентеровірусів мають низький ступінь спорідненості до бентоніту при слабколужних рН, а отже є $A_{\text{бент}}^-$, що повністю узгоджується з нашими даними [105, 126]. Л.В. Копаниця (2003) рекомендує бентонітовий тест для внутрішньотипової диференціації поліовірусів I типу, оскільки, за її даними, 84,9% польових ізолятів поліовірусів I типу вакцинного походження мають генетичний маркер $A_{\text{бент}}^+$, а штами поліовірусів I типу з характеристиками диких 100% представлені варіантом $A_{\text{бент}}^-$ [61].

Тому дослідники вважають бентонітовий маркер інтегральним показником, який свідчить про ряд біологічних властивостей виділених ентеровірусних штамів та використовується при вивченні як клінічних ізолятів, так і виділених ентеровірусів із об'єктів зовнішнього середовища (стічних вод) [19, 98, 100].

За даними літератури, віруси з бентонітовим маркером $A_{\text{бент}}^-$ мають зазвичай більший діаметр бляшок та є чутливішими до дії активного хлору [19, 98, 100]. Тому для нас було важливим визначити маркер S виділених нами штамів вірусів. Маркер S, як зазначалось вище, вперше був описаний як властивість атенуйованих штамів поліовірусів утворювати дрібні бляшки під агаровим покриттям. Віруси Коксакі та ЕСНО також гетерогенні за величиною бляшок. Поліовіруси, віруси ЕСНО 7, 8, 12 викликають утворення округлих бляшок з чіткими краями. Для вірусів Коксакі В та більшості вірусів ЕСНО притаманне сповільнене утворення округлих бляшок з розмитими краями [19]. Описані відмінності у розмірах бляшок, які утворювали віруси Коксакі: слабопатогенні для мишей штами вірусу Коксакі А9 індукували утворення дрібних бляшок, тоді як інші штами цього вірусу давали в експерименті великі бляшки, що не відрізнялись від бляшок, індукованих поліовірусами. Водночас, Коксакі В типу 1, 2, 3, 4, 5 індукували утворення великих бляшок з нерівними краями та «пухнастим» центром [23]. Два варіанти вірусу ЕСНО 6 утворювали великі та дрібні бляшки, які мали неоднакову чутливість до інгібіторів, що були присутні в агарі [23]. Дослідження генетичних ознак ряду мутантів вірусу ЕСНО 9, що були ізольовані методом бляшок з навколишнього середовища, показало, що виділені мутанти можуть відрізнятися за низкою ознак: вірулентністю для мишей, здатністю розмножуватись у культурі тканин при підвищеній температурі (t_{ct40}^+), індукувати утворення бляшок та цитопатичну дію на культурі клітин [23]. На думку Ю.З. Гендона, наведені відхилення у розмірі бляшок популяцій ентеровірусів є неуспадкованими фенотиповими проявами, що не пов'язані зі змінами генотипу вірусів [23].

Запропонований В.П. Широбоковим спосіб виявлення бляшок ентеровірусів під бентонітовим поживним покриттям відрізняється більшою чутливістю, швидкістю, простотою та доступністю застосування, аніж під агаровим покриттям. В.П. Широбоков зазначає, що прояв маркеру S поліовірусів під бентонітовим покриттям є прямо протилежним порівняно з агаровим покриттям, де більш вірулетні штами індукують бляшки більшого розміру [126].

При вивченні генетичного маркеру S під бентонітовим покриттям виділені нами віруси за розміром бляшок, що утворились під впливом вірусів, були поділені на дві групи: такі, що індукували появу дрібних бляшок розміром до 1,5 мм (маркер S⁻), та такі, що індукували появу великих бляшок розміром від 1,5 мм і більше (маркер S⁺). Виділені нами штами вірусів ЕСНО 29, Коксакі В4 та один неідентифікований штам вірусу індукували появу великих бляшок з фестончатими краями (маркер S⁺). Більшість штамів вірусів, а саме: штами вірусів Коксакі В2, Коксакі В3, ЕСНО 6, ЕСНО 9, ЕНСО 27 (обидва штами), ЕСНО 29, неідентифіковані віруси (два штами) індукували появу дрібних бляшок з рівнішими краями. Тобто, ці віруси мали генетичний маркер S⁻.

Як зазначає В.П. Широбоков, ентеровіруси під бентонітовим покриттям можуть індукувати бляшки, що є неоднорідними за величиною. Також було показано відмінності у розмірі бляшок, які були індуковані дикими штамами поліовірусів 2 та 3 типів, аніж бляшки їх атенуйованих варіантів. Вірулентний штам Saukett викликав появу бляшок малого розміру, а штам Себіна цього ж типу поліовірусу – появу більших за розміром бляшок [19, 126]. Отже, маркер S також може бути використаним для внутрішньотипової диференціації виділених ентеровірусів.

За нашими даними, при визначенні маркеру gct_{40} усі виділені віруси характеризувались маркером gct_{40}^+ .

Узагальнюючи отримані нами дані щодо генетичних маркерів виділених вірусів, можемо зазначити наступне: 7 штамів ентеровірусів (63,6%),

виділених із сироватки хворих з ГПМК (Коксакі В 2 та В 3, ЕСНО 6, ЕСНО 9, ЕСНО 27 (обидва ізоляти) та один неідентифікований вірус) характеризувались низьким афінітетом до бентоніту ($A_{\text{бент}}^-$), здатністю репродукуватись при температурі $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (rct_{40}^+) та викликали появу дрібних бляшок з рівним краєм у культурі клітин під бентонітовим покриттям (маркер S-). Три штами виділених ентеровірусів мали інші характеристики маркерів вірулентності, а саме: Коксакі В4 мав маркери $A_{\text{бент}}^-$, S+, rct_{40}^+ , один з неідентифікованих штамів ентеровірусів мав маркери $A_{\text{бент}}^-$, S+, rct_{40}^+ , а інший не ідентифікований вірус мав маркери $A_{\text{бент}}^+$, S-, rct_{40}^+ .

Отже, наші дані щодо низької здатності до сорбції до бентоніту ($A_{\text{бент}}^-$) у 10 з 11 вірусів (90,9%), виділених з сироватки крові хворих з ГПМК, співпадають з даними Л.М. Гриценко (2011), згідно яких більшість (63,16%) штамів вірусів ЕСНО, виділених від хворих осіб, мали низьку здатність до адсорбції на бентоніті ($A_{\text{бент}}^-$) [30].

Водночас, всі 11 вірусів, виділених із сироватки крові хворих з ГПМК, за нашими даними, мали маркер rct_{40}^+ . Це узгоджується з даними В.П. Широбокова, який довів, що при підвищених температурах більш активно репродукуються більш вірулентні Коксакі В1 та поліовірус II типу MEF1 у порівнянні з маловірулентними вірусами Коксакі В6 та вакцинним штамом поліовірусу II типу Себіна, що повністю співпадає з даними Ю.З. Гендона та інших авторів [19, 23, 126]. Механізм даного явища може залежати від різних причин. На моделі поліовірусів показано, що при $39,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ припиняється синтез комплементарної вірусної РНК і починається швидка деградація вже синтезованої вірусної РНК за рахунок активації нуклеаз лізосом [19, 23, 126]. Ю.З. Гендон зі співавторами проводили порівняльне вивчення генетичних маркерів вірулентних і атенуйованих штамів вірусів поліомієліту. Було показано, що вірулентні штами були здатними розмножуватись у культурі клітин при підвищеній температурі і характеризувались маркером rct_{40}^+ , на відміну від атенуйованих штамів [23]. Менше даних є по відношенню до генетичних маркерів rct_{40} у вірусів Коксакі

та ЕСНО. Було показано, що штами вірусу Коксакі А7 з генетичним маркером rct_{40}^+ були високонейровірулентними для мавп і дорослих хлопкових щурів та володіли вираженим міотропізмом. Штами з маркером rct_{40}^- були апатогенними [19].

Гриценко Л.М. (2011) виявила, що штами вірусів ЕСНО, ізольовані від здорових осіб (72,2%), характеризувались маркером rct_{40}^- , і лише 16,67% вірусних штамів характеризувались маркером rct_{40}^+ . При цьому більшість вірусних штамів, ізольованих від хворих осіб, мали переважно маркер rct_{40}^+ (73,68%), 10,53% штамів мали варіант rct_{40}^- , решта (15,79%) штамів мали проміжний варіант [30]. Всі 11 штамів ентеровірусів (100%), виділених нами з сироваток крові хворих з ГПМК, мали маркер rct_{40}^+ . Отже, вивчені нами штами ентеровірусів мають спільні характеристики за використаними генетичними маркерами, що дозволяє застосувати їх для внутрішньотипової диференціації вірусів і може слугувати при вивченні ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК.

Було співставлено результати наших досліджень з даними Понятовського В.А. (2015), який виділяв ентеровіруси зі стічних вод та вивчав прояви генетичних маркерів виділених вірусів. За його даними, поліовіруси мали усі негативні маркери вірулентності, у Коксакі В найчастіше реєструвався позитивний маркер S+, у ЕСНО вірусів – rct_{40}^+ , у нетипованих – $A_{\text{бенг}}^-$) [98].

Результати наших досліджень, згідно яких виділені клінічні ізоляти ентеровірусів (10 з 11 ізолятів), характеризувались бентонітовим маркером $A_{\text{бенг}}^-$, узгоджуються з даними О.І. Євтушенко. Він довів, що віруси Коксакі В переважно асоціюються з генетичним маркером $A_{\text{бенг}}^-$, який здатний долати плацентарний бар'єр у вагітних мишей та викликає загибель у 91,2 % плодів і новонароджених мишенят, у той час як варіант $A_{\text{бенг}}^+$ – у 30,3 % [36].

Також, за даними В.М. Гиріна, виявлено високий кореляційний зв'язок між бентонітовим маркером і маркером rct_{40} у 100% штамів виділених ним зі стічних вод поліовірусів, у 60,5% вірусів ЕСНО та 55,0% у вірусів Коксакі. На

підставі дослідження даних маркерів В.М. Гирін робить висновок про присутність вірулентних штамів ентеровірусів у стічних водах [24].

За нашими даними, з досліджених ізолятів ентеровірусів найчастіше було виявлено маркер gct_{40}^+ (усі 11 ізолятів), на другому місці був бентонітовий маркер $A_{\text{бент}}^-$ (10 з 11 ізолятів) та прояв маркеру S- (8 з 11 ізолятів). Отже, на підставі вивчення генетичних маркерів виділених нами ентеровірусів у сироватках крові хворих з ГПМК та аналізу даних літератури можемо стверджувати не лише про вірулентність ізольованих нами вірусів, але і наявність спільних фенотипових характеристик вірусів, причетних до ГПМК.

Отримані нами результати узгоджуються з даними Плоткіна В.Я. та ін. про значимість непіліомієлітних ентеровірусів у розвитку серцево-судинної патології [138, 139]. У ряді своїх досліджень Плоткін В.Я. та ін. вказують, що ентеровіруси можуть відігравати суттєву роль у пошкодженні ендотелію судин вже на початкових етапах розвитку атеросклерозу, а перенесена ентеровірусна інфекція є незалежним фактором ризику розвитку гострого інфаркту міокарда. Це підтверджується виявленням антигенів ентеровірусів у периферійній крові 12,9% хворих з неускладненим інфарктом міокарда, у 36,4% пацієнтів з ускладненим інфарктом міокарда та у 57,1% випадків у тканині серцевого м'яза хворих на інфаркт міокарда, які померли внаслідок кардіогенного шоку та розриву міокарда [139]. Більше того, ентеровірусна інфекція у хворих на інфаркт міокарда є однією з причин розвитку ендотеліальної дисфункції, а поєднання ентеровірусної інфекції та серцевої недостатності у хворих на інфаркт міокарда призводить до зростання дисфункції ендотелію, що є одним з важливих етапів у патогенезі серцево-судинної патології [139].

Подібні дослідження, проведені Zhang L. et al., виявили в крові 49% пацієнтів з гострим коронарним синдромом антигени ентеровірусів у модифікованій реакції зв'язування комплексу, тоді як у пацієнтів з інфарктом міокарда, які померли внаслідок кардіогенного шоку та/або розриву міокарда, ентеровірусні антигени виявлялись в тканинах коронарних артерій у

98% випадків, у тканинах серця – у 54,3% випадків. Водночас, частка хворих, у яких у крові було виявлено ентеровірусний антиген, була вищою серед хворих на інфаркт міокарда з ускладненням у вигляді кардіогенного шоку або розриву міокарда, аніж у пацієнтів з неускладненим інфарктом міокарда. Zhang et al. визнають, що ентеровіруси є одним з факторів ризику гострого коронарного синдрому, приймають участь у його розвитку та сприяють виникненню ускладнень (кардіогенний шок і розрив міокарда) [174].

Як свідчать дані літератури, ентеровіруси, зокрема віруси Коксакі В, відомі як кардіотропні віруси [4, 25, 105, 127], однак даних щодо їх участі у етіології та патогенезі при ГПМК в літературі не було знайдено. За результатами нашого дослідження у 9 хворих із 72 хворих ($12,5 \pm 3,9\%$) основної групи були виявлені лабораторні маркери перенесеної ентеровірусної інфекції: за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу не було виявлено ентеровірусів у сироватках крові, але виявлено специфічні Ig G в ІФА. Ці результати свідчать, що певна кількість хворих з ГПМК перенесли у минулому ентеровірусні інфекції, внаслідок яких утворились антитіла до ентеровірусів, які збереглися у діагностичних титрах.

Також було виявлено присутність Ig M та Ig G у сироватках крові 4 хворих з ГПМК і виділено ентеровірусні геноми, що дає підстави припустити наявність у них персистуючої хронічної інфекції у стадії загострення або ж реінфекції. Виявлення у сироватках крові 4 хворих ентеровірусного геному у ПЛР, а також Ig G, за відсутності Ig M у ІФА, може свідчити про наявність у цих хворих хронічної ентеровірусної інфекції. Водночас, виявлення у сироватках крові 6 хворих ентеровірусного геному у ПЛР, а також Ig M, за відсутності Ig G у ІФА, дає можливість припустити наявність у цих хворих гострої ентеровірусної інфекції.

Звертає на себе увагу відсутність Ig M та Ig G у сироватках крові трьох ПЛР-позитивних хворих, що можна розцінити як наявність персистуючої ентеровірусної інфекції, оскільки явище тривалої персистенції притаманне ентеровірусам [123, 131]. За даними літератури, віруси при латентній інфекції

можуть бути присутні внутрішньоклітинно і тому не виявляться, що значно ускладнює діагностику [140]. При цьому дефектні вірусні частинки або ж вірусні геноми можуть бути виявлені в ПЛР, як у нашому випадку. На нашу думку, відсутність Ig M та Ig G можна пояснити досить слабкою імунною відповіддю, яка властива латентній інфекції або ж хронічній персистуючій у стадії ремісії. Окрім того, відсутність Ig M та Ig G, за даними ІФА, може пояснюватись низьким титром антитіл, які не може виявити застосована нами комерційна тест-система. Водночас, подальші дослідження особливостей формування імунної відповіді при персистуючій ентеровірусній інфекції можуть бути корисними для вивчення ролі ентеровірусів у патогенезі ГПМК.

Отже, нами було визначено наявність лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції у 26 хворих із 72 хворих (36,1%) основної групи, а саме: у 6 хворих були виявлені лабораторні маркери гострої ентеровірусної інфекції (за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виявлено ентеровіруси у сироватках крові, та було виявлено специфічний Ig M); у 8 хворих були виявлені лабораторні маркери хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення (за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виділено ентеровіруси у сироватках крові, та в ІФА визначені специфічні Ig G або Ig M та Ig G); у 9 хворих були виявлені лабораторні маркери перенесеної ентеровірусної інфекції (за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу не було виявлено ентеровірусів у сироватках крові, але виявлено специфічні Ig G в ІФА); у 3 хворих було виявлено лабораторні маркери персистуючої ентеровірусної інфекції (за результатами ПЛР було виявлено РНК ентеровірусів у сироватках крові, але специфічних Ig M та Ig G виявлено не було). У 46 хворих основної групи не було виявлено лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції.

Водночас, звертає на себе увагу більша частка осіб з хронічною персистуючою ентеровірусною інфекцією, про що свідчить присутність Ig G та виділення вірусів або їх геномів у сироватках крові цих хворих. На нашу

думку, це підтверджує можливу тригерну роль як гострої, так і хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у патогенезі ГПМК.

Можливо, ентеровірусна інфекція та ГПМК у серопозитивних хворих з відсутністю виділення вірусів та/або їх геномів із сироватки крові була роз'єднана в часі, але виникнення ГПМК стало закономірним наслідком даної інфекції.

Отримані нами дані узгоджуються з висновками Кротенко О.В. відносно таких представників ентеровірусів, як віруси Коксакі В. У її дослідженні було встановлено підвищену частоту виявлення віруснейтралізуючих антитіл до вірусів Коксакі В (серотипи 1-6) в діагностичних титрах у хворих на нестабільну стенокардію в порівнянні зі здоровими та хворими на стабільну стенокардію, збільшення титрів антитіл в парних сироватках до 8 разів у 20,0% серопозитивних хворих. На підставі цього автор робить висновок про зв'язок між Коксакі В вірусною інфекцією та нестабільною стенокардією [66].

О.В. Кротенко довела, що віруси Коксакі В спричинюють ліпідомодулюючі ефекти: підвищення вмісту ейкозатрієнової, арахідонової поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), суми ненасичених та поліненасичених жирних кислот, що сприяє збільшенню проникності біологічних мембран та, відповідно, проникненню вірусів у клітину. Найбільш вираженим даний ефект є для вірусів Коксакі В серотипів 2, 3, 4. За даними О.В. Кротенко, застосування у комплексній терапії хворих на нестабільну стенокардію препарату Текому на основі ω -3 ПНЖК зменшує частоту переходу стенокардії у більш високий функціональний клас, сприяє зниженню в мембранах еритроцитів, підвищенню вмісту вільного холестерину (на 31%), нормалізує сумарний вміст ПНЖК, ω -3 та ω -6 ПНЖК в складі ЛПНЩ, ЛПВЩ та мембран еритроцитів, що обумовлює фізіологічну оптимізацію синтезу ейкозаноїдів [66].

Важливим було співставлення результатів нашого дослідження з даними Амосової К.М. та Гиріної О.М., які проводили ретроспективне серологічне дослідження хворих з серцево-судинною патологією [4, 26]. За даними

Амосовій К.М., у 33 хворих на дилатаційну кардіоміопатію знаходили антитіла до всіх серотипів вірусів Коксакі В у діагностичних та вищих титрах, частота виявлення антитіл перевищувала такі показники в групі здорових у межах від 12,9% до 40,6% (залежно від серотипу віруса). Частка серопозитивних осіб у контрольній групі була 36%, а сероконверсія реєструвалась у 87,9% хворих, що дозволило Амосовій К.М. зробити висновок про можливий етіологічний зв'язок дилатаційної кардіоміопатії з Коксакі В вірусною персистентною інфекцією або реінфекцією [4].

За даними Гиріної О.М., частка серопозитивних на Коксакі В віруси осіб, у яких антитіла виявлялись в діагностичних титрах та вищих титрах, серед хворих на гострий інфаркт міокарда склало 90,0%, тоді як частка серопозитивних до вірусів Коксакі В серед здорових осіб склала 19,0%. В парних сироватках спостерігали динаміку антитілоутворення, значний ріст титрів антитіл (у 8-32 рази), що, на думку автора, є серйозним підтвердженням перенесеної ентеровірусної інфекції хворими даної групи та є підставою для припущення участі вірусів Коксакі В та їх асоціацій у патогенезі інфаркту міокарду [26].

Аналіз даних Амосової К.М., Гиріної О.М., Кротенко О.В., Широбокова В.П. та інших разом з результатами власних досліджень свідчить про інтенсивне інфікування ентеровірусами осіб з різними формами серцево-судинної патології, а саме: гострий інфаркт міокарда, дилатаційна кардіоміопатія, міокардити, нестабільна стенокардія, ГПМК [4, 26, 66, 68, 127]. Важливим результатом нашого дослідження є підтвердження вірусологічним та молекулярно-генетичним методами виділення ентеровірусів та їх геномів із сироваток крові хворих з ГПМК як прояву ентеровірусної інфекції.

Аналіз наукових джерел дозволив встановити важливу роль раніше перенесеної інфекції у етіопатогенезі ГПМК: випадки інфекції, яка розвивається до та після інсульту, добре вивчені, їм присвячено велику кількість наукових робіт. Зокрема, дослідженнями продемонстровано

збільшення ризику виникнення інсульту впродовж першого року після перенесеної інфекції, спричиненої VZV (від 31% до 45%) [172, 282]. Інші дослідники зазначають, що ризик виникнення інсульту після інфекції, спричиненої VZV, з часом знижується, та є найбільшим через 4 тижні (1,63), дещо меншим через 5-12 тижнів (1,42) та ще меншим через 13-26 тижнів (1,23) [253]. Також вірусні інфекції верхніх дихальних шляхів, грип, герпесвірусні інфекції можуть збільшувати ризик виникнення інсульту, викликаючи системну запальну реакцію, та призводити до підвищення згортання крові, дестабілізації раніше утворених атеросклеротичних бляшок і місцевого тромбозу [117, 246, 266].

За нашими даними, було встановлено, що ГРВІ в анамнезі за 1-14 днів (упродовж двох тижнів) до госпіталізації з приводу ГПМК було у 33 хворих (45,8%) основної групи, що пояснює виявлення ентеровірусів з крові цих хворих у перший день госпіталізації та може слугувати підтвердженням ролі ентеровірусної інфекції як тригера у розвитку ГПМК.

Важливим для визначення ролі вірусних агентів у етіопатогенезі ГПМК є дослідження Лихачова С.А. та ін., у якому було показано, що інфекційні ускладнення при інфаркті мозку супроводжувались збільшенням частоти виявлення Ig M до HSV 1 та 2, що автори розглядали як непряме підтвердження активації латентної герпесвірусної інфекції при інсульті. У пацієнтів з наявністю Ig M до двох та більше вірусних та/або бактеріальних збудників автори визначали більш виражені прояви системного запалення, дисліпідемії, дестабілізації атеросклеротичних бляшок, а також тяжчий перебіг інсульту з більш вираженим неврологічним дефіцитом. Вищий загальний рівень Ig M до CMV, HSV 1 та 2, H. pylori у сироватках крові хворих на інфаркт мозку може бути також пов'язаний з активацією інфекційних збудників у судинній стінці, непрямим підтвердженням чого є більш виражені прояви АС, вищий вміст маркерів системного запалення та дисліпідемії в групі пацієнтів з виявленими антитілами, особливо до двох та більше збудників інфекційних хвороб [46].

Виявлено сезонність виділення ентеровірусів від хворих з ГПМК з піками у квітні та жовтні-листопаді. Слід зауважити, що, за даними Прилуцького А.С. та співавторів, виділення ентеровірусів із стічних вод співпадає з підвищенням рівня захворюваності на ентеровірусні інфекції в місцевості, де проводилося дослідження [104]. Отримані нами дані узгоджуються з даними Понятовського В.А., який вказує на залежність частоти виділення ентеровірусів зі стічних вод м. Києва від сезону року. Водночас, автор наголошує на відсутності повної кореляції між клінічними серотипами та серотипами, які виділяються із проб стічних вод [99]. Отримані дані дозволяють припустити можливу тригерну роль персистуючої ентеровірусної інфекції у розвитку ГПМК.

За даними нашого дослідження було встановлено особливості перебігу ГПМК у хворих з ознаками персистуючої ентеровірусної інфекції. Встановлено, що ентеровірусна інфекція може провокувати ГПМК у хворих молодшого віку навіть за відсутності інших факторів ризику. Показано, що середній вік хворих з ГПМК, у яких за результатами ПЛР та/або вірусологічного методу було виявлено геном ентеровірусів чи ентеровіруси у сироватках крові та виявлені специфічні Ig G або Ig G та Ig M до них в ІФА (серопозитивні хворі), становив $53,9 \pm 7,7$ роки, а серонегативних хворих, у яких не було виявлено ентеровіруси у сироватках крові, – $63,8 \pm 10,5$ роки. Також звертає на себе увагу старший вік хворих, у сироватках крові яких було виявлено РНК ентеровірусів, проте ані Ig G, ні Ig M у жодній із сироваток крові виявлено не було. Такі результати наводять на думку про наявність у цих хворих персистуючої ентеровірусної інфекції, при якій відсутні клінічні прояви інфекції, відсутня активна репродукція вірусів, що не дає змогу їх виділити за допомогою вірусологічного методу та є причиною того, що імуноглобуліни не виявляються в діагностичних титрах.

Важливо відзначити, що, за даними Кротенко О.В., нестабільна стенокардія у серопозитивних відносно Коксакі В вірусної інфекції хворих припадає на більш молодий вік при меншій кількості класичних факторів ризику, таких як спадковість, ожиріння, має тяжчий клінічний перебіг,

супроводжується підвищенням частоти розвитку інфаркту міокарда та переходу до вищого функціонального класу стенокардії після стабілізації (на 37,8%) у порівнянні із серонегативними хворими [66, 68].

Проаналізовані дані щодо тригерної ролі ентеровірусів у патогенезі ГПМК є новими науковими фактами, які мають суттєве теоретичне та у перспективі практичне значення.

Результати даного дослідження демонструють перспективність використання молекулярно-генетичного методу для виявлення ентеровірусів у хворих з ГПМК. Перевагою застосування генетичного методу діагностики (ПЛР) перед вірусологічним є вища чутливість та специфічність методу, значна економія часу, можливість виявлення ентеровірусів, що не реплікуються у культурі клітин, ідентифікації генотипу збудника [57, 78, 101, 104, 191, 192]. У майбутньому швидка ідентифікація етіологічного агента дозволила б адекватно коригувати терапію і тим самим поліпшити перебіг захворювання та прогноз. На даний час розробляються та удосконалюються молекулярно-генетичні методи діагностики ентеровірусної інфекції [149, 152, 155, 191, 209, 241, 255]. Так, розроблена гніздова ЗТ-ПЛР, що передбачає ампліфікацію геномної області, що кодує вірусний структурний білок VP1, для прямої ідентифікації ентеровірусів у клінічних зразках, що дозволило виявити серотипи ентеровірусів групи В, включаючи відносно рідкісні віруси ЕСНО 14, ЕСНО 15 та ЕСНО 32, а також ентеровірусів А71 (EV-A71). Розроблений метод може бути корисним для прямої ідентифікації ентеровірусів у клінічному матеріалі з низьким вірусним навантаженням [194]. Подальші дослідження будуть зосереджені на всебічному вивченні виділених нами штамів ентеровірусів з визначенням тих, що відіграють етіопатогенетичну роль у виникненні та розвитку ГПМК. Окрім того, вважаємо за доцільне зазначити про перспективність профілактики ГПМК за допомогою вакцини, до якої варто було б внести найбільш актуальні з епідеміологічної та етіопатогенетичної точки зору штами ентеровірусів [115].

На нашу думку, для діагностики ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК доцільно застосовувати поєднання ПЛР для виявлення геномів ентеровірусів та ІФА для виявлення Іg М та Іg G до ентеровірусів. Застосування вірусологічного методу діагностики та вивчення генетичних маркерів дозволяє проводити типову та внутрішньотипову диференціацію виділених штамів ентеровірусів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на підставі власних комплексних досліджень вирішено актуальне науково-практичне завдання – встановлено тригерну роль ентеровірусів у розвитку гострого порушення мозкового кровообігу на підставі визначення присутності ентеровірусів та їх геномів у сироватках крові у частки хворих з ГПМК та наявності специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів у хворих з ГПМК; ідентифіковано серотипи виділених штамів ентеровірусів та вивчено їх генетичні маркери, обґрунтовано доцільність застосування поєднання молекулярно-генетичного (ПЛР), вірусологічного та серологічного (ІФА) методів дослідження для доведення ролі ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК.

Основні результати дослідження наведені в наступних висновках:

1. Доведено, що з сироваток крові хворих з ГПМК геноми ентеровірусів виділяються достовірно частіше, ніж у пацієнтів групи порівняння ($23,6 \pm 5,9\%$ та $2,9 \pm 2,8\%$ відповідно, $p < 0,05$). З 17 ПЛР-позитивних сироваток крові хворих основної групи у 11 випадках ізольовано вірусні агенти, які ідентифіковано як віруси Коксакі В (серотипи 2, 3, 4), віруси ЕСНО (серотипи 6, 9, 27 (два штами), 29) та три неідентифікованих штами вірусів.
2. Встановлено, що досліджені ізоляти ентеровірусів характеризуються певними генетичними характеристиками: в усіх 11 ізолятів виявлено маркер gct_{40}^+ , у 10 з 11 ізолятів – бентонітовий маркер $A_{\text{бент}}^-$, прояв маркеру S– мали 8 з 11 ізолятів. Ці спільні ознаки можуть розглядатись як допоміжні при вивченні ролі ентеровірусів у розвитку ГПМК. Застосування вірусологічного методу діагностики з вивченням генетичних маркерів дозволяє проводити типову і внутрішньотипову диференціацію виділених штамів ентеровірусів, асоційованих з ГПМК.
3. На підставі вірусологічного, молекулярно-генетичного, серологічного методів досліджень показано, що лабораторні маркери ентеровірусної

інфекції були виявлені у 26 хворих (36,1%) з 72 хворих з ГПМК (основна група), а саме: у 6 хворих (перша підгрупа) були виявлені лабораторні маркери гострої ентеровірусної інфекції (виявлено ентеровіруси та/або їх геном та специфічні Ig M у сироватках крові); у 8 хворих були виявлені лабораторні маркери хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення (виявлено ентеровіруси та/або їх геном та специфічні Ig G або Ig M та Ig G у сироватках крові); у 9 хворих (третя підгрупа) були виявлені лабораторні маркери перенесеної ентеровірусної інфекції (не виявлено ентеровірусів у сироватках крові, але виявлено специфічні Ig G до ентеровірусів); у 3 хворих (четверта підгрупа) було виявлено лабораторні маркери персистуючої ентеровірусної інфекції (виявлено РНК ентеровірусів у сироватках крові, але специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів не виявлено). У 46 хворих (п'ята підгрупа) не було виявлено лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції. Лабораторні маркери ентеровірусної інфекції були виявлені лише у 3-х осіб (8,6%) з 35 осіб групи порівняння, з яких 1 особа була ПЛР-позитивна, і у двох осіб було виявлено лише специфічні Ig G до ентеровірусів.

4. Встановлено, що середній вік хворих з лабораторними маркерами хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції становив $53,9 \pm 7,7$ роки, тоді як у хворих без лабораторних маркерів ентеровірусної інфекції – $63,8 \pm 10,5$ роки ($p < 0,05$). Показано, що тяжкість перебігу ГПМК у хворих з лабораторними маркерами, що свідчать про загострення хронічної ентеровірусної інфекції, при госпіталізації та через тиждень становила $5,6 \pm 1,7$ та $2,5 \pm 2,1$ балів (за шкалою NIHSS) відповідно, що достовірно нижче, ніж у інших підгрупах хворих основної групи ($p < 0,05$). Встановлено наявність ГРВІ в анамнезі за 1-14 днів до госпіталізації з приводу ГПМК у 41 хворого основної групи (56,9%), зокрема у 100% хворих з лабораторними маркерами хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у стадії загострення та у 83,3 % хворих з лабораторними

маркерами гострої ентеровірусної інфекції. Виявлено сезонність виділення ентеровірусів від хворих з ГПМК з піками у квітні та жовтні-листопаді.

5. Обґрунтовано необхідність поєднання класичного вірусологічного, молекулярно-генетичного і серологічного методів дослідження для виявлення ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Отримані результати наукового дослідження довели, що ентеровірусні інфекції є важливим фактором ризику розвитку ГПМК. Враховуючи сезонність виділення ентеровірусів від хворих з ГПМК з піками у квітні та жовтні-листопаді, рекомендовано проводити діагностику ентеровірусної інфекції у хворих з ГРВІ в анамнезі за 1-14 днів до госпіталізації з приводу ГПМК. Для діагностики гострої та хронічної персистуючої ентеровірусної інфекції у хворих з ГПМК рекомендовано поєднання ПЛР для виявлення геномів ентеровірусів та виявлення специфічних Ig M та Ig G до ентеровірусів в ІФА. Застосування вірусологічного методу діагностики з вивченням генетичних маркерів дозволяє проводити типову і внутрішньотипову диференціацію виділених штамів ентеровірусів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Адрианов А.В., Адрианов М.А. Наиболее часто встречаемые нарушения ритма и проводимости сердца у детей, перенесших острый Коксаки В миокардит // *Bulletin of the International Scientific Surgical Association*. 2018. №2 (7). С. 5—7.
2. Аймагамбетова А.О. Атерогенез и воспаление // *Science & Healthcare*. 2016. № 1. С. 24—39.
3. Александров И.А., Архипов Г.С., Кириллова Е.Н. Результаты исследования клинического материала от больных и лиц с подозрением на энтеровирусную инфекцию на территории Новгородской области за 2007-2013 годы // *Вестник Новгородского государственного университета*. 2015. № 2 (85). С. 68—71.
4. Амосова Е. Н. Дилатационная кардиомиопатия (клиника, особенности, дифференциальная диагностика с ревматическими пороками сердца, лечение): автор. дис...д-ра мед. наук: (14.00.06) // Киев НИИ кардиологии им. Н. Д. Стражеско. Киев. 1996. С. 44.
5. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. К., 2006. 558с.
6. Атерогенез у человека – клинические аспекты циркулирующих иммунных комплексов / Бабинцева Я.Д., Сергеева А.М., Карагодин В.П., Орехов А.Н. // *Клиническая медицина*. 2016. №94 (5). С. 325—332. DOI 10.18821/0023-2149-2016-94-5-325-332 (дата звернення: 20.07.2017).
7. Атеросклероз (краткие сведения истории развития, причины, патогенез заболевания, факторы риска, принципы профилактики) / И.А. Латфуллин. – Казань : Изд-во Казан. ун-та, 2015. – 144 с.
8. Ахрамєєва Н. В. Вплив вірусів поліомієліту та їх бентонітових варантів на пухлинні процеси в експерименті. : автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.06 вірусологія. К., 1999. 20 с.

9. Біостатистика / Москаленко В. Ф. та ін.; за заг. ред. В. Ф. Москаленка. К. : Книга плюс, 2009. 184 с.
10. Бобир В. В., Широбоков В. П. Поверхневі структури вірусів Коксакі В та їх селекціонованих варіантів // Науковий вісник НМУ імені О.О. Богомольця. 2005. № 1—2. С. 9—12.
11. Бобир В.В. Поверхневі компоненти вірусів Коксакі В та їх селекціонованих варіантів: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.06 – вірусологія. Київ, 2005. 141 с.
12. Боброва Е.Е., Щупакова А.Н., Семенов В.М. Особенности клинической манифестации ИБС при гриппе и ОРВИ. Роль молекул клеточной адгезии. Литературный обзор. // Вестник ВГМУ, 2015. Том 14, №1. С. 12-17.
13. Бойко И. И. Энтеровирусы в водопроводной воде и обнаружение их с помощью бентонита: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 — вірусологія. Київ, 1987. 21 с.
14. Вирусы герпеса человека и атеросклероз. Современный взгляд / Никитская Е. А. и др. // Креативная кардиология. 2015. № 2. С. 54—62.
15. Віничук С. М., Муравська О. М., Бедрій І. І. Роль герпетичної інфекції у розвитку порушень мозкового кровообігу // Журнал практического врача. 1998. №1. С. 40—42.
16. Вінничук С. М. Мозковий інсульт: сучасний погляд на проблему та стратегію лікування // Мистецтво лікування. 2004. № 5. С. 8—15.
17. Возможное участие отдельных групп микроорганизмов, выделенных из атеросклеротических изменённых коронарных артерий, в патогенезе атеросклероза / Скочко О. В. и др. // Імунологія та алергологія. 2012. № 1. С. 106—107.
18. Волянська Л.А., Горішна І.Л., Косовська В.О. Особливості ентеровірусної інфекції сезону 2016 року в дітей Тернопільського регіону // Актуальная инфектология. 2017. Том 5, № 1. С. 35—41. DOI: 10.22141/2312-413x.5.1.2017.98773

19. Ворошилова М. К. Энтеровирусные инфекции человека. М.: Медицина, 1979. 360 с.
20. Гайсенюк О. В., Рожков А. Н., Лишута А. С. Гиполипидемическая терапия в аспекте профилактики острых нарушений мозгового кровообращения: существующие стандарты, данные доказательной медицины и реальная практика // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2018. №14 (3). С. 434—440. DOI: 10.20996/1819-6446-2018-14-3-434-440.
21. Ганджа І. М. Вірусна інфекція, атеросклероз та ішемічна хвороба серця // Лік. справа. 2001. № 1. Р. 65—67.
22. Гелетюк Ю.Л., Черенько Т.М. Функціональне і неврологічне відновлення неврологічного дефіциту та характеристика якості життя у хворих з ішемічним інсультом на тлі артеріальної гіпертензії різних ступенів тяжкості // Вісник ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». 2015. Т. 15, №3 (51), ч. 1. С.72-76.
23. Гендон Ю. З. Генетика вирусов человека и животных // М.: Издательство «Наука», 1967. 356 с.
24. Гири́н В. Н. Энтеровирусы в сточных водах и научное обоснование способов деkontаминации: дис. ... доктора медицинских наук : 03.00.06, 14.00.07. Киев, 1982. 303 с.
25. Гирина О. Н. Вирусы и иммунная реактивность при ишемической болезни сердца // Український кардіологічний журнал. 1995. № 6. С. 73—78.
26. Гирина О.Н. Иммунопатогенетические и эндокринные изменения при различных формах ишемической болезни сердца в условиях вирусной инфекции и их терапевтическая коррекция [Текст] : дис... д-ра мед. наук: 14.01.11 / Гирина Ольга Николаевна ; Национальный медицинский ун-т им. А.А. Богомольца. К., 1996. 341 с.

27. Горбась І. М. Профілактика хронічних неінфекційних захворювань – реальний шлях поліпшення демографічної ситуації в Україні // Український кардіологічний журнал. 2009. № 3. С. 6—11.
28. Гострі порушення мозкового кровообігу за даними нейрохірургічного відділення лікарні швидкої медичної допомоги м. Києва / Поліщук М. Ю. та ін. // Міжнародний неврологічний журнал. 2009. № 8 (30). С. 75—77.
29. Гострі порушення мозкового кровообігу: діагностика і лікування : методичні рекомендації / Мурашко Н. К. та ін. Київ, 2013. 47 с.
30. Гриценко Л.М. Генотипові та фенотипові ознаки вірулентності вірусів ЕСНО / дис. ... канд. мед. наук: 03.00.06 – вірусологія. Київ, 2011. 145 с.
31. Деадаптація сердечно-сосудистой системы в условиях инфекции как фактора активации хронического воспаления при атеросклерозе / Грибовская И.А. и др. // Здоровье и образование в XXI веке. 2016. Т. 18, №2. С. 571—574.
32. Дисфункция эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях: факторы риска, методы диагностики и коррекции / Воробьева Е. Н. и др. // Acta Biologica Sibirica. 2016. № 2 (1). С. 21—40.
33. Доан С. И., Малыш Н. Г. Проблемные вопросы эпидемиологического надзора за энтеровирусными неполиомиелитными инфекциями в Украине // Journal of the Grodno State Medical University. 2018. Vol. 16 (1). P. 18—22. doi: 10.25298/2221-8785-2018-16-1-18-22
34. Егоров А. А. Гемагглютинирующая активность вирусов Коксаки группы В и их селекционированных вариантов: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 – вирусология. Київ, 1990. 23 с.
35. Энтеровіруси та серце / В.П. Ширококов В.П. та ін. // В зб.: „Актуальні питання медичної мікробіології та вірусології”. (До 100-річчя народження С. С. Дяченка). Київ, 1998. С. 82—91.
36. Євтушенко О. І. Энтеровіруси у патології плода та новонароджених: автореф. дис. ... д. мед. наук: 03.00.06 — вірусологія. Київ, 2007. 35 с.

37. Євтушенко О. І., Некрасова Л. С., Приходько Є. Ф. Ентеровіруси у навколишньому середовищі та серед людей // Довкілля та здоров'я. 2006. № 3. С. 66—69.
38. Жданюк Ю.И., Гомозоева Е.А., Такташов Г.С. Диагностическое значение определения специфического иммуноглобулина А при поражении миокарда, вызванном энтеровирусной инфекцией // Вісник ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». 2016. Т. 15, випуск 3 (51), частина 2. С. 120—123.
39. Журба Т. Б., Широбоков В. П. К патогенезу вирус-индуцированного диабета // Врачебное дело. 1985. № 10. С. 1—5.
40. Жусупова А.С., Таутанова Р.С. Факторы риска развития ишемического инсульта // Вестник КазНМУ. 2017. № 1. С. 259—263.
41. Задорожна В. І. Сучасний погляд на ентеровіруси та фактори їх передачі (огляд літератури та власних досліджень) // Environment & Health. 2012. № 4. С. 49—54.
42. Задорожна В.І., Гриневич О.Й., Соломаха Л.М. Еволюційні зміни епідемічного процесу ентеровірусної інфекції, що викликається ентеровірусом D типу 68: від спорадичних випадків до епідемічного поширення // Профілактична медицина. 2015. № 1-2 (24). С. 3—15.
43. Зайцев В. М., Лифляндский В. Г., Маринкин В. И. Прикладная медицинская статистика. СПб: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2003. 432 с.
44. Зарипова З. А. Роль энтеровирусной инфекции в течении острого периода ишемической болезни сердца: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.05. / Санкт-Петерб. госуд. универ. Федер. агентства по образованию. Санкт-Петербург, 2007. С. 24.
45. Зинченко Е. К. Адаптационный резерв организма больных с вегетативными нарушениями в структуре посттравматического и хронического воспалительного поражения центральной нервной системы на фоне снижения системного артериального давления

- (Аналитический обзор литературы. Часть III) // Міжнародний неврологічний журнал. 2015. № 4 (74). С. 112—117.
46. Значение антител иммуноглобулинов М к ряду инфекционных возбудителей как маркеров инфицирования пациентов в остром периоде инфаркта мозга при атеросклерозе экстракраниальных артерий / Лихачёв С. А. и др. // Журнал неврології ім. Б.М. Маньковського. 2014. Т. 2, № 3. С. 52—57.
47. Иванцов О. А. Эпидемиологическая характеристика острых нарушений мозгового кровообращения среди населения г. Гомеля и гомельского района // Проблемы здоровья и экологии. 2015. № 2 (44). С. 68—72.
48. Ижбульдина Г. И., Новикова Л. Б., Тимербаева Д. А. Метаболические аспекты острого периода ишемического инсульта // Пермский медицинский журнал. 2018. Т. XXXV, № 1. С. 5-11. DOI 10.17816/pmj3515-11
49. Иммунная система человека и особенности патогенеза герпетической инфекции (обзор) / Собчак Д.М. и др. // Современные технологии в медицине. 2014. Т.6, №3. С. 118—127.
50. Иммунопатогенез сердечной недостаточности у пациентов с инфекционно-иммунным миокардитом / Палеев Ф. Н. и др. // Российский кардиологический журнал. 2016. № 1 (129). С. 32—40.
51. Иммунопатогенетические аспекты ишемического инсульта / Черных Е.Р., Шевела Е.Я., Морозов С.А., Останин А.А. // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 1. С. 19—34.
52. Индуцирующая роль вирусов острых респираторных вирусных инфекций в прогрессии атеросклеротического процесса / Сурнин С. А. и др. // Проблемы и перспективы современной науки. 2011. № 3 (1). 57—58.
53. Инсульт у детей. Формирование педиатрического регистра инсультов: международный и региональный опыт. / Щедеркина И. О. и др. // Русский журнал детской неврологии. 2018. №13 (1). С. 7—19.

54. Исаков В. А., Архипова Е. А., Исаков Д. В. Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей. СПб.: СпецЛит, 2013. 670 с.
55. Исаков Д. В., Исаков В. А. Новые аспекта патогенеза простого герпеса (обзор) // Вестник гематологии. 2016. Том 12, №4. С. 13—18.
56. Канаева О.И. Энтеровирусная инфекция: многообразие возбудителей и клинических форм // Инфекция и иммунитет. 2014. Т.4, № 1. С. 27—36.
57. Клинические проявления энтеровирусной инфекции у взрослых на современном этапе / Бондаренко А. Л. и др. // Вятский медицинский вестник. 2012. № 1. С. 9—13.
58. Клініка, діагностика й лікування VZV-васкулопатій церебральних артерій / Мальцев Д.В., Євтушенко С.К., Горбенко В.Ю., Бондарчук О.Л. // Міжнародний неврологічний журнал. 2018. № 3 (97). С. 69—86. DOI: 10.22141/2224-0713.3.97.2018.133684
59. Клінічні особливості уражень нервової системи у хворих з моноінфекцією EBV і в асоціації з іншими герпесвірусами при їх реактивації та персистенції / Руденко А. О. та ін. // Актуальна інфектологія. 2017. №5 (6). С. 260-264. doi: 10.22141/2312-413x.5.6.2017.122136
60. Козлов В. Г., Хапчаев Ю. Х., Ишмухаметов А. А. Энтеровирусная (неполио) инфекция и проблемы ее диагностики // Ремедиум. 2016. № 4. С. 49—52.
61. Копаниця Л. В. Біологічні властивості поліовірусів, поширених на території України : дис... канд. мед. наук : 03.00.06 — вірусологія. К., 2003. 151 с.
62. Коржова Т. П. Терапія псоріазу з урахуванням особливостей клінічного перебігу дерматозу, процесів ліпопероксидації та при наявності ентеровірусної інфекції в організмі: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.20 – шкірні та венеричні хвороби. Київ, 2002. 20 с.

63. Корнацкий В. М. Проблема болезней системы кровообращения и пути ее минимизации в Украине // Кардиология: от науки к практике. 2013. № 5. С. 22—24.
64. Корнюшенко О. М. Імунопатогенез експериментального поліомієліту з позицій гетерогенності популяцій поліовірусів: автореф. дис. ... д. біол. наук: 03.00.06 – вірусологія. Київ, 1999. 35 с.
65. Костенко І. Г. Антигенні та генетичні відмінності дисоціантів вірусів поліомієліту: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.06 – вірусологія. Київ, 2004. 20 с.
66. Кротенко О. В. Зміни ліпідного метаболізму у хворих на нестабільну стенокардію на фоні Коксакі В вірусної інфекції та їх терапевтична корекція: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.11. Нац. мед. ун-т ім. О. О. Богомольця. К., 2001. 20 с.
67. Литвяков М. А., Литвяков А. М., Шмаков А. П. Клинико-патогенетические особенности формирования атеросклеротических поражений сосудистого русла у взрослых и детей при инфекционных заболеваниях в терапевтической и хирургической клиниках // Вестник ВГМУ. 2012. Т. 11, № 3. С. 5—13.
68. Ліпідокоригуюча та імуномодуюча ефективність нового вітчизняного препарату Текому при лікуванні нестабільної стенокардії / Амосова К. М. та ін. // Український кардіологічний журнал. 2000. №1—2. С. 31—37.
69. Луста К. А., Орехов А. Н. Роль провоспалительных и противовоспалительных предикторов в атерогенезе // Клиническая и экспериментальная морфология. 2014. № 3 (11). С. 64—76.
70. Лутай М. И., Голикова И. П., Слободской В. А. Роль дисфункции эндотелия, воспаления и дислипидемии в атерогенезе // Укр. кардиол. журн. 2007. № 5. С. 37—47.

71. Луцкий И. С. Цереброкардиальные факторы риска в условиях действия производственного психоэмоционального напряжения // Международный неврологический журнал. 2014. № 6 (68). С. 9—16.
72. Львов Н. Д. Герпесвирусы человека – системная, интегративная, лимфопролиферативная иммуноонкопатология // РМЖ. 2012. № 22. С. 1133.
73. Манахаев Б.К., Жуманазаров Н.А. Основные факторы риска сосудистых заболеваний в молодом возрасте (обзор) // Вестник КазНМУ. 2016. № 2. С. 285—288.
74. Мартынова Г.П. Энтеровирусная (неполио) инфекция у детей // Сибирское медицинское обозрение. 2014. № 3. С. 100—106.
75. Матвієнко С. О., Дяченко М. С. Тригерне значення персистуючих внутрішньоклітинних збудників при тривалих лихоманках з подальшим розвитком соматичної патології у дітей // Scientific Journal «ScienceRise: Medical Science». 2017. № 9 (17). С. 32—36.
76. Мекенбаев Р. Т., Тлепова А. Ж. Состояние сердечно-сосудистой системы у новорожденных и детей раннего возраста с ВПС, перенесших хроническую внутриутробную и / или перинатальную гипоксию // Клиническая медицина Казахстана. 2013. № 3 (29). С. 21—25.
77. Мельник В. В. Гетерогенність популяцій вірусів Коксакі В за фізико-хімічними властивостями: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.02.06 – вірусологія. Київ, 1996. 24 с.
78. Методичні підходи до молекулярно-генетичної діагностики ентеровірусних інфекцій / Прилуцький А. С. и др. // Методичні підходи до молекулярно-генетичної діагностики ентеровірусних інфекцій. 2013. Т. 9, № 2. С. 252—254.
79. Механизмы регуляции воспаления в ишемизированном мозге (Научный обзор) / Баринов Э. Ф. и др. // Международный неврологический журнал. 2013. № 8 (62). С. 13—21.

80. Микробный пейзаж биоптатов атеросклеротических бляшек / Шарифуллина Д.М. и др. // Казанский медицинский журнал. 2015. Т. 96, № 6. С. 979—982.
81. Митрофанова Л. Б., Кудайбергенова А. Г., Антонова И. В. Фибрилляция предсердий, амилоидоз, миокардит и вирусная инфекция. // Артериальная гипертензия. 2009. Т. 15, № 2. С. 203—209.
82. Митрофанова Л. Б., Шляхто Е. В., Ковальский Г. Б. Ревматические пороки сердца и энтеровирусы // Российский кардиологический журнал. 2005. № 5. URL: <http://cardio.mtdi.ru/6650509a.htm> (дата звернення: 20.07.2017).
83. Міщенко Т. М. Епідеміологія неврологічних захворювань в Україні // Нейро. News. 2008. № 3. С. 76—78.
84. Возможность персистенции энтеровирусной инфекции в шахтарів, хворих на хронічне обструктивне захворювання легень / Л.В. Долінчук Л.В. та ін. // Укр. журн. з проблем медицини праці. 2014. №1 (38). С. 11—17.
85. Молекулярно-клеточные изменения при атеросклерозе / Аладинский В. А. и др. // Клиническая медицина. 2015. № 6. С. 14—18.
86. Мурина Е.А., Голева О.В., Осипова З.А. Методы вирусологической диагностики герпесвирусных инфекций (обзор литературы) // Медицина экстремальных ситуаций. 2015. № 1. С. 27—40.
87. Найпоширеніші клінічні форми ентеровірусної інфекції у Дніпропетровському регіоні / Будаєва І.В. та ін. // Актуальна інфектологія. 2017. №5. С. 213—216. DOI: 10.22141/2312-413x.5.5.2017.121631
88. Неверов В.А., Васильев В.В., Демиденко Т.П. Герпесвирусные инфекции, вызываемые нейротегментальнотропными вирусами (HSV-I, II и VZV). Часть I // Российский семейный врач. 2017. № 21 (1). С. 29—38. DOI: 10.17816/RFD2017129-38
89. Неверов В.А., Васильев В.В., Демиденко Т.П. Герпесвирусные инфекции, вызываемые нейротегментальнотропными вирусами (HSV-I,

- II И VZV). Часть II // *Российский семейный врач*. 2017. № 21 (2). С. 13 — 21. DOI: 10.17816/RFD2017213-21
90. Неверов В.А., Демиденко Т.П., Васильев В.В. Герпесвирусные инфекции, вызываемые лимфотропными вирусами. Часть III // *Российский семейный врач*. 2018. Т. 22. № 1. С. 5-11. doi 10.17816/RFD201815-11
91. Опыт проведения биопсии миокарда в терапевтической клинике: отбор пациентов, непосредственные результаты, значение в выборе тактики лечения / Благова О. В., Сулимов В.А., Недоступ А. В., Коган Е.А. // *Российский кардиологический журнал*. 2015. № 5 (121). С. 82–92. <http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2015-05-82-92>.
92. Ордабаев Ж.К., Засорин Б.В., Канаткалиева Е.А. Роль микробного фактора в патогенезе атеросклероза // *Медицинский журнал западного Казахстана*. 2016. №2 (50). С. 24—27.
93. Орехов А. Н., Тертов В. В., Собенин И. А. Модифицированные липопропротеиды и атеросклероз. Saarbrücken, Verlag, LAP Lambert Academic publishing, 2012. 295 с. URL: e-book-978-3-8433-8798-9.pdf (дата звернения: 20.07.2017)..
94. Офіційні матеріали Державного комітету статистики, 2015. URL: <http://www.unn.com.ua> (дата звернення: 20.07.2017).
95. Панкрушина А. Н., Судакова Е. С. Вирусная инфекция как фактор риска развития атеросклероза // *Вестник ТеГУ. Серия «Биология и экология»*. 2014. № 1. С. 80—85.
96. Перемот М. В., Смілянська М. В. Персистуюча герпесвірусна інфекція: роль при соціально значущих захворюваннях в Україні // *Аннали Мечниковського інституту*. 2009. № 3. С. 44—48.
97. Плоткин В.Я., Бобровская З.Д., Гамзаева М.Е. Энтеровирусы группы В, кардиогенный шок и разрыв миокарда у пожилых пациентов на фоне энтеровирусной инфекции. Механизм действия // *Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. Всероссийская*

- научно-практическая конференция с международным участием. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого». 2016. Т. 11, ч. 2. С. 613—615.
98. Понятовський В. А. Ентеровіруси в стічних водах міста Києва: видовий склад та біологічні властивості: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.06 – вірусологія. / Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця. К., 2015. 45 с.
99. Понятовський В. А., Бобир В. В., Ширококов В. П. Очищення стічних вод від ентеровірусів та бактеріофагів на спорудах бортницької станції аерації // Мікробіол. журн. 2014. Т. 76, № 2. С. 53—58.
100. Применение бентонита для выявления энтеровирусов у человека и во внешней среде: методические рекомендации, МЗ УССР. Киев, 1986 г. 23 с.
101. Применение молекулярно-генетических методов при расследовании вспышек энтеровирусной инфекции в субъектах Дальневосточного федерального округа / Бутакова Л.В. и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. № 2 (87). С. 43—47.
102. Про затвердження методичних вказівок "Вірусологічний моніторинг у системі епідеміологічного нагляду за ентеровірусними інфекціями та шляхи його удосконалення": наказ МОЗ України від 18 лютого 2008 р. № 86 [Текст] / Україна.
103. Palm F., Urbanek C., Grau A. Infection, its treatment and the risk for stroke // *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2009. Vol. 7, № 2. P. 146—152.
104. Разработка и применение современных лабораторных методов в эпидемиологическом мониторинге, диагностике и лечении энтеровирусных инфекций / Прилуцкий А. С. и др. // Таврический медико-биологический вестник. 2009. Т. 12, № 3 (47). С. 63—68.
105. Роль ентеровірусів в неінфекційній патології / Ширококов В. П. та ін. // Проблемы медицины. 1998. № 3. С. 20—25.

106. Роль Коксаки В вірусної інфекції в етіології та патогенезі псоріазу / Коржова Т. П. та ін. // Лікарська справа. 2001. № 3. С. 54—58.
107. Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита, ВООЗ, Женева. 4-е издание. Москва, 2005. 112 с.
108. Самороднова Е.А., Пикуза О.И. Хламидиозы у детей: неизвестное об известном // Практическая медицина. 2014. №9 (85). С. 60—66.
109. Сердечно-сосудистые поражения при инфекционных заболеваниях / Тотолян А. А. и др. // Вестник Российской Академии медицинских наук. 2003. № 12. С. 56—61.
110. Сичова В. В. Імуномодуюча роль вірусів поліомієліту у патогенезі експериментальних інфекцій: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.06 – вірусологія, 14.00.36 – алергологія і імунологія. Київ, 1993. 21 с.
111. Случай поражения сердца при смешанной стрептококковой и Эпштейна – Барр вирусной инфекции / Левина А.С. и др. // Педиатр. 2016. Том 7, №3. С. 147-152. DOI: 10.17816/PED73147-152
112. Современные представления о роли микроорганизмов в индуцировании и развитии атеросклероза (обзор) / Купрюшин А.С. и др. // Саратовский научно-медицинский журнал. 2016. № 12 (2). С. 113–117.
113. Современные представления об иммуновоспалительных механизмах атеросклероза / Карпов А. М. и др. // Атеросклероз и дислипидемии. 2014. № 1. С. 25—30.
114. Соотношение количественных характеристик и функциональных свойств липопротеинов в атерогенезе. Обзор литературы / Гуревич С.В., Уразгильдеева С.А., Бутхашвили М.И., Васина Л.В. // Вестник СПбГУ. Сер.11. 2014. Вып. 1. С. 67-75.
115. Состояние и перспективы разработки вакцины для специфической профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции / Яговкин Э.А. и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. № 4 (89). С. 74—82.

116. Сравнительная оценка результативности методов сбора и концентрирования проб сточной воды для контроля за циркуляцией полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов в окружающей среде / Бичурина М. А. и др. // Здоровье населения и среда обитания. 2004. №10. С. 14—19.
117. Статинова Е. А., Омельченко Р. Я., Аурсалиди А. О. Вирусы герпеса в развитии атеросклероза брахиоцефальных артерий у пациентов с хронической ишемией мозга // Международный неврологический журнал. 2014. №5 (67). С. 49—54.
118. Суслина З. А., Пирадов М. А. Инсульт: диагностика, лечение, профилактика. М., МЕДпресс-информ. 2009. 288 с.
- 119.** Сучасні методи лабораторної діагностики ентеровірусних інфекцій / Уклад. Широбоков В. П. та ін. Національний медичний університет, Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л. В. Громашевського НАМН України. Київ, 2012. 24 с.
120. Сучасні погляди на роль ентеровірусів у патології серцево-судинної системи / Бондаренко В. І. та ін. // Профілактична медицина. 2008. № 3. С. 57—62.
121. Тріщинська М. А., Головченко Ю. І. Поширеність судинних факторів ризику в осіб із початковими проявами ішемії мозку // Міжнародний неврологічний журнал. 2014. № 8. С. 31—39. Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Mnzh_2014_8_8. (дата звернення: 20.07.2017).
122. Турчина Н. С. Клініко-експериментальне обґрунтування ролі вірусної інфекції в розвитку та наслідках ішемічного інсульту // Український неврологічний журнал. 2017. №1 (42). С.17—32.
123. Фролов А. Ф., Задорожная В. И. Молекулярная эпидемиология вирусных и прионных инфекций. К.: ДИА, 2010. 280 с.

124. Фролова И. А. Индукция интерферонообразования полиовирусами и их бентонитовыми вариантами: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06 – вирусология. Киев, 1989. 21 с.
125. Чекаліна Н. І., Казаков Ю. М., Петров Є. Є. Механізми атерогенезу: основи патогенетичної терапії // Вісник проблем біології і медицини. 2014. Вип. 4, Т. 2 (114). С. 27—32.
126. Ширококов В. П. Сравнительное изучение биологических свойств вирусов Коксаки и их селекционированных вариантов: дис. ... д. мед. наук: 03.00.06 – вирусология. Киев, 1977. 333 с.
127. Ширококов В. П., Амосова К. М., Кротенко О. В. Роль Коксаки В вірусної інфекції в етіопатогенезі нестабільної стенокардії // Український кардіологічний журнал. 1999. № 2. С. 9–12.
128. Ширококов В. П., Ахрамеєва Н.В., Корнюшенко О.Н. Перспективы использования энтеровирусов для профилактики и терапии опухолей // Экспериментальная онкология. 2000. Т. 22, № 3. С. 166.
129. Ширококов В. П., Костенко І. Г. Диференціація бентонітових варіантів поліовірусів за допомогою моноклональних антитіл // Журнал АМН України. 2003. Т. 9, № 4. С. 780—790.
130. Ширококов В. П., Костенко І. Г., Ніколаєнко І. В. Антигенні відмінності генетичних варіантів $A_{\text{бент}}^+$ та $A_{\text{бент}}^-$ вакцинного штаму поліовірусу III типу // Мікробіологічний журнал. 2003. Т. 65, №4. С. 29—37.
131. Ширококов В. П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник. Вінниця : Нова книга, 2011. 952 с.
132. Ширококов В. П., Амосова Е. Н., Кротенко А. В. Роль вірусів Коксаки В в патогенезі нестабільної стенокардії // Мат. науч. конф. “Актуальные вопросы медицинской вирусологии”. М., 1999. С. 55.
133. Щорічна доповідь про стан здоров'я населення, санітарно-епідемічну ситуацію та результати діяльності системи охорони здоров'я

- України. 2014 рік / За ред. Квіташвілі О. // МОЗ України, ДУ «УІСД МОЗ України». К., 2015. 460 с.
134. Энтеровирус и острый период инфаркта миокарда / Воронель В. Л. и др. // Вестник Санкт-Петербургского университета, 2006. № 4. С. 11—16.
135. Энтеровирусная инфекция у детей: клинико-эпидемиологические особенности на современном этапе / Мартынова Г. П. и др. // Детские инфекции. 2016. № 3. С. 15—18.
136. Энтеровирусная инфекция у новорожденного / Богданова А.В., Самодова О.В., Кригер Е.В., Лобанов Е.А. // Детские инфекции. 2015. № 1. С. 63—64.
137. Энтеровирусные инфекции: современные особенности / Анохин В. А. и др. // Практическая медицина. Педиатрия. 2014. №9 (85). С. 58—67.
138. Энтеровирусы и острый коронарный синдром / Плоткин В. Я. и др. // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2009. № 3. С. 38—44.
139. Энтеровирусы и функция эндотелия в остром периоде инфаркта миокарда. Сообщение 3. / Плоткин В. Я. и др. // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2008. Вып. 4, сер. 11. С. 3—12.
140. Юлиш Е. И. Персистирующие инфекции и человек. Стратегия взаимоотношений // Здоровье ребенка. 2009. № 4 (19). Электронный ресурс: <http://www.mif-ua.com/archive/article/9462> (дата звернення: 20.07.2017).
141. Якушин С. А., Кистенева Л. Б. Влияние персистенции вируса Эпштейна-Барр на развитие иммуноопосредованных соматических заболеваний // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2018. № 1 (63). С. 22—27.
142. 5'terminal deletions in the genome of a coxsackievirus B2 strain occurred naturally in human heart / Chapman N. M. et al. // Virology. 2008.

- Vol. 5. doi: 10/1016/.virol.2008.02.003 10.1016/j.virol.2008.02.030 (дата звернення: 27.05.2016).
143. A case of coxsackie B virus infection leading to multiorgan inflammation: myopericarditis and acute liver failure / Zaheeruddin S. et al. // Case Repot in Medicine. 2014. Vol. 1, № 2. P. 45—50. doi: 10.5430/crim.v1n2p45 (дата звернення: 10.08.2017).
144. Abundance of enterovirus C in RD-L20B cell culture-negative stool samples from acute flaccid paralysis cases in Nigeria is geographically defined / Donbraye E. et al. // J. Med. Microbiol. 2018. Vol. 67 (6). P. 854—865. doi: 10.1099/jmm.0.000737 (дата звернення: 20.08.2018).
145. Activation of T lymphocytes in atherosclerosis plaques / Grivel J. C. et al. // Arterioscler. Tyromb. Vasc. Biol. 2011. Vol. 31, № 12. P. 2929—2937.
146. Acute inflammatory state during influenza infection and endothelial function / Marchesi S. et al. // Atherosclerosis. 2005. Vol. 178 (2). P. 345—350.
147. Acute loss of apolipoprotein E triggers an autoimmune response that accelerates atherosclerosis / Centa M. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2018. doi: 10.1161/ATVВАНА (дата звернення: 26.08.2018).
148. Advances in Stroke 2017 / Bernhardt J. et al. // Stroke. 2018. Vol. 49 (5). P. 174—199. doi: 10.1161/STROKEАНА.118.021380 (дата звернення: 20.07.2018).
149. Amplification and next generation sequencing of near full-length human enteroviruses for identification and characterisation from clinical samples / Isaacs S.R. et al. // Sci. Rep. 2018. Vol. 8 (1). doi: 10.1038/s41598-018-30322-у (дата звернення: 26.08.2018).
150. An emerging and expanding clade accounts for the persistent outbreak of Coxsackievirus A6-associated hand, foot, and mouth disease in China since 2013 / He S. et al. // Virology. 2018. Vol. 518. P. 328—334. doi: 10.1016/j.virol.2018.03.012.

151. Analysis of an echovirus 18 outbreak in Thuringia, Germany: insights into the molecular epidemiology and evolution of several enterovirus species B members / Krumbholz A. et al. // *Med. Microbiol. Immunol.* 2016. Vol. 205 (5). P. 471—483. doi: 10.1007/s00430-016-0464-z (дата звернення: 27.07.2017).
152. Analysis of clinical information and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for early diagnosis of enteroviral meningitis / Jin D. et al. // *Korean J. Pediatr.* 2015. Vol. 58 (11). P. 446—450. doi: 10.3345/kjp.2015.58.11.446 (дата звернення: 2.08.2017).
153. Anti-cytomegalovirus IgG antibody titer is positively associated with advanced T cell differentiation and coronary artery disease in end-stage renal disease / Yang F. J. et al. // *Immun. Ageing.* 2018. Vol. 15. P. 15. doi: 10.1186/s12979-018-0120-0 (дата звернення: 28.08.2018).
154. Antigenic and receptor binding properties of enterovirus 68 / Imamura T. et al. // *J. Virol.* 2014. Vol. 88 (5). P. 2374—2384. doi: 10.1128/JVI.03070-13.
155. Applicability of integrated cell culture reverse transcriptase quantitative PCR (ICC-RTqPCR) for the simultaneous detection of the four human enteric enterovirus species in disinfection studies / Ryu H., Schrantz K. A., Brinkman N. E., Boczek L. A. // *J. Virol. Methods.* 2018. Vol. 258. P. 35—40. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.05.008 (дата звернення: 12.08.2017).
156. Arévalo-Lorido J. C., Carretero-Gómez J., Pérez-Monteoliva R.N.R. Association between serum uric acid and carotid disease in patients with atherosclerotic acute ischemic stroke // *Vascular.* 2018. Vol. 11. doi: 10.1177/1708538118797551 (дата звернення: 05.09.2018).
157. Atypical hand, food, and mouth disease associated with Coxsackievirus A6 infection, Edinburgh, United Kingdom, January to February 2014 / Sinclair C. et al. // *Euro Surveill.* 2014. Vol. 19 (12). doi: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.12.20745> (дата звернення: 26.08.2018).

158. Boehme A. K., Esenwa C., Elkind M. S. Stroke risk factors, genetics, and prevention // *Circ. Res.* 2017. Vol. 120 (3). P. 472—495. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308398 (дата звернення: 09.04.2018).
159. Bonetti P. O., Lerman L. O., Lerman A. Endothelial dysfunction: marker of atherosclerotic risk // *Atheroscler. Tromb. Vasc. Biol.* 2003. Feb. 23 (2). P. 168—175.
160. Burch G. E., Harb J. M., Hiramoto Y. Viral infection of the aorta of men associated with early atherosclerotic changes // *Amer. Heart J.* 1973. Vol. 86. P. 523.
161. Campbell L. A., Rosenfeld M. E. Persistent *C. pneumoniae* infection in atherosclerotic lesions: rethinking the clinical trials // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014. Vol. 4. P. 34. doi: 10.3389/fcimb.2014.00034 (дата звернення: 28.08.2018).
162. Carotid intima media thickness and blood biomarkers of atherosclerosis in patients after stroke or myocardial infarction / Kurkowska-Jastrzebska I. et al. // *Croat. Med. J.* 2016. Vol. 57 (6). P. 548—557.
163. Caserta T. Overview of enterovirus infections. Last full review. [Content last modified August 2013]. URL: <http://www.merckmanuals.com/professional/infectious-diseases/enteroviruses/overview-of-enterovirus-infections> (дата звернення: 14.06.2017).
164. Cellular tropism of Human Enterovirus D species serotypes EV-94, EV-70 and EV-68 in vitro – implications for pathogenesis / Smura T. et al. // *Journal of Medical Virology.* 2010. Vol. 82. P. 1940—1949.
165. Chlamydia and lipids engage a common signaling pathway that promotes atherogenesis / Chen S. et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018. Vol. 71 (14). P. 1553—1570. doi: 10.1016/j.jacc.2018.01.072 (дата звернення: 28.08.2018).

166. Chlamydia pneumoniae and oxidative stress in cardiovascular disease: state of the art and prevention strategies / Pietro M. et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16 (1). P. 724—735. doi: 10.3390/ijms16010724
167. Chlamydia pneumoniae Hijacks a host autoregulatory IL-1 β loop to drive foam cell formation and accelerate atherosclerosis / Tumurkhuu G. et al. // *Cell. Metab.* 2018. Vol. 28 (3). P. 432—448. doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.027 (дата звернення: 20.08.2018).
168. Chlamydia pneumoniae infection exacerbates atherosclerosis in ApoB100only/LDLR-/- Mouse Strain / Lantos I. et al. // *Biomed. Res. Int.* 2018. doi: 10.1155/2018/8325915 (дата звернення: 26.08.2018).
169. Chronic infection and genetic factors in the development of ischemic stroke / Kis Z. et al. // *New Microbiologica.* 2007. Vol. 30. P. 213—220.
170. Ciszewski A. Cardioprotective effect of influenza and pneumococcal vaccination in patients with cardiovascular diseases // *Vaccine.* 2018. Vol. 36 (2). P. 202—206. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.078 (дата звернення: 20.07.2018).
171. Clinical risk factors for acute ischaemic and haemorrhagic stroke in patients with infective endocarditis / Valenzuela I. et al. // *Intern. Med. J.* 2018. Vol. 48 (9). P. 1072—1080. doi: 10.1111/imj.13958 (дата звернення: 28.08.2018).
172. Comment on ischemic stroke after herpes zoster / Galassi G., Genovese M., Meacci M., Malagoli M. // *J. Med. Virol.* 2018. doi: 10.1002/jmv.25257 (дата звернення: 28.07.2018).
173. Comparative analysis of viral shedding in pediatric and adult subjects with central nervous system-associated enterovirus infections from 2013 to 2015 in Switzerland / Cordey S. et al. // *J. Clin. Virol.* 2017. Feb. 7 (89). P. 22—29. doi: 10.1016/j.jcv.2017.01.008 (дата звернення: 14.06.2017).
174. Complete genome sequence of a Coxsackievirus B3 recombinant isolated from an aseptic meningitis outbreak in eastern China / Zhang W. et

- al. // Arch. Virol. 2016. Vol. 161 (8). P. 2335—2342. doi: 10.1007/s00705-016-2893-9 (дата звернення: 27.07.2017).
175. Connolly T., Mahoney E. Stroke survivors' experiences transitioning from hospital to home // J. Clin. Nurs. 2018. Vol. 27 (21—22). P. 3979—3987. doi: 10.1111/jocn.14563 (дата звернення: 20.08.2018).
176. Coronary artery calcium and intima-media thickness are associated with level of cytomegalovirus immunoglobulin G in HIV-infected patients / Knudsen A. et al. // HIV Med. 2018. DOI: 10.1111/hiv.12672 (дата звернення: 09.09.2018).
177. Correlation of hyper-homocysteinemia with coronary artery disease in absence of conventional risk factors among young adults / Shah H., Jan M. U., Altaf A., Salahudin M. / J. Saudi Heart Assoc. 2018. Vol. 30 (4). P. 305—310. doi: 10.1016/j.jsha.2018.04.002 (дата звернення: 25.08.2018).
178. Coxsackieviral B infection is associated with disruption of dystrophin in endomyocardial tissue of patients who died suddenly of acute myocardial infarction / Andreoletti L. et al. // Journal of American College of Cardiology. 2007. Vol. 50. № 23. P. 2207—2214. doi: 10.1016/j.jacc.2007.07.080 (дата звернення: 23.07.2017).
179. Coxsackievirus B1 is associated with induction of β -cell autoimmunity that portends type 1 diabetes / Laitinen O. H. et al. // Diabetes. 2014. V. 63. P. 446—455.
180. C-reactive protein as a predictor of cardiovascular risk in HIV-infected individuals / Westhorpe C. L. et al. // Sex Health. 2014. Vol. 11 (6). P. 580—582. doi: 10.1071/SH14130 (дата звернення: 28.07.2017).
181. C-reactive protein can be an early predictor of poststroke apathy in acute ischemic stroke patients / Chen L. et al. // J. Stroke Cerebrovasc. Dis. 2018. Vol. 27 (7). P. 1861—1869. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.02.021(дата звернення: 05.09.2018).
182. C-reactive protein in the detection of post-stroke infections: systematic review and individual participant data analysis / Bustamante A. et al. // J.

- Neurochem. 2017. Vol. 141 (2). P. 305—314. doi: 10.1111/jnc.13973 (дата звернення: 2.08.2017).
183. C-reactive protein predicts hematoma growth in intracerebral hemorrhage / Di Napoli M. et al. // Stroke. 2014. Vol. 45 (1). P. 59—65. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.001721 (дата звернення: 26.08.2017).
184. Cross-platform metabolic profiling deciphering the potential targets of Shenfu injection against acute viral myocarditis in mice / Tan G. et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2018. Vol. 160. P. 1—11. doi: 10.1016/j.jpba.2018.07.042. (дата звернення: 28.08.2018).
185. Cytomegalovirus infection and atherosclerosis risk: A meta-analysis / Jia Y. J. et al. // J. Med. Virol. 2017. № 89 (12). P. 2196—2206. doi: 10.1002/jmv.24858 (дата звернення: 28.08.2018).
186. Dahal U., Sharma D., Dahal K. An unsettled debate about the potential role of infection in pathogenesis of atherosclerosis // J. Clin. Med. Res. 2017. V. 9 (7). P. 547—554. doi: 10.14740/jocmr3032w (дата звернення: 12.08.2017).
187. Definition and implications of the preventable stroke / Fisher M., Moores L., Alsharif M. N., Paganini-Hill A. // JAMA Neurol. 2016. 73 (2). P. 186-189. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.3587 (дата звернення: 25.05.2018).
188. Detection and identification of coxsackievirus B3 from sera of an Indonesian patient with undifferentiated febrile illness / Wiyatno A. et al. // J. Infect. Dev. Ctries. 2016. Vol. 31, №10 (8). P. 880—883. doi: 10.3855/jidc.7573 (дата звернення: 24.07.2017).
189. Detection of human herpes virus DNA in coronary artery in patients who died in acute stage of myocardial infarction / Nikitskaya E.A. et al. // Kreativnaya Kardiologiya. 2014. №4. P. 52—64 (in Russian).
190. Detection of polioviruses in sewage using cell culture and molecular methods / Figas A., Wiczorek M., Litwińska B., Gut W. // Pol. J. Microbiol. 2017. Vol. 65 (4). P. 479—483. doi: 10.5604/17331331.1227676 (дата звернення: 28.08.2018).

191. Development of single-step multiplex real-time RT-PCR assays for rapid diagnosis of enterovirus 71, coxsackievirus A6, and A16 in patients with hand, foot, and mouth disease / Puenpa J. et al. // *J. Virol. Methods*. 2017. Vol. 248. P. 92—99. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.06.013 (дата звернення: 28.07.2017).
192. Diagnostic assay development for poliovirus eradication / Gerloff N. et al. // *J. Clin. Microb.* 2018. Vol. 56 (2). doi: 10.1128/JCM.01624-17 (дата звернення: 28.06.2018).
193. Dietary docosahexaenoic acid reduces oscillatory wall shear stress, atherosclerosis, and hypertension, most likely mediated via an IL-1-mediated mechanism / Alfaidi M. A. et al. // *J. Am. Heart Assoc.* 2018. Vol. 7 (13). doi: 10.1161/JAHA.118.008757 (дата звернення: 26.08.2018).
194. Direct identification of enteroviruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected meningitis by nested PCR amplification / Krasota A. et al. // *Viruses*. 2016. Vol. 6 (8). doi: 10.3390/v8010010 (дата звернення: 27.07.2017).
195. Divergent pathogenic properties of circulating Coxsackievirus A6 associated with emerging hand, foot, and mouth disease / Wang S. H. et al. // *J. Virology*. 2018. Vol. 92 (11). doi: 10.1186/1743-422X-9-8 (дата звернення: 26.08.2018).
196. Docosahexaenoic acid attenuates the detrimental effect of palmitic acid on human endothelial cells by modulating genes from the atherosclerosis signaling pathway / Novinbahador T. et al. // *J. Cell Biochem.* 2018. doi: 10.1002/jcb.27294 (дата звернення: 28.08.2018).
197. Downregulation of miR-34a promotes endothelial cell growth and suppresses apoptosis in atherosclerosis by regulating Bcl-2 / Su G. et al. // *Heart Vessels*. 2018. Vol. 33 (10). P. 1185—1194. doi: 10.1007/s00380-018-1169-6 (дата звернення: 28.06.2018).

198. Du Y., Zhang G., Liu Z. Human cytomegalovirus infection and coronary heart disease: a systematic review // *Virol. J.* 2018. Vol. 15 (1). P. 31-38. doi: 10.1186/s12985-018-0937-3 (дата звернення: 28.08.2018).
199. Effect of plasma fibrinogen, high-sensitive C-reactive protein, and cigarette smoking on carotid atherosclerosis: the Suita Study / Kawase Ishihara K. et al. // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2015. Vol. 24 (10). P. 2385—2389. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.06.039 (дата звернення: 20.07.2018).
200. Elevated C-reactive protein and depressed high-density lipoprotein cholesterol are associated with poor function outcome after ischemic stroke / Zheng X. et al. // *Curr. Neurovasc. Res.* 2018. doi: 10.2174/1567202615666180712100440 (дата звернення: 27.08.2018).
201. Emergence of Coxsackie A6 hand-foot-and-mouth disease and comparative severity of Coxsackie B vs. echovirus infections, 2014-2016, UK / Тео К. W. et al. // *J. Infect.* 2018. doi: 10.1016/j.jinf.2018.08.007. (дата звернення: 26.08.2018).
202. Endothelial ATP-binding cassette G1 in mouse endothelium protects against hemodynamic-induced atherosclerosis / Xue S. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. Vol. 477 (2). P. 247—254. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.050
203. Enteroviral proteases: structure, host interactions and pathogenicity / Laitinen O. H. et al. // *Rev. Med. Virol.* 2016. Vol. 26 (4). P. 251—267. doi: 10.1002/rmv.1883. (дата звернення: 20.07.2017).
204. Enterovirus infections in Singaporean children: an assessment of neurological manifestations and clinical outcomes / Thong W. Y. et al. // *Singapore Med. J.* 2016. doi: 10.11622/smedj.2016099 (дата звернення: 26.08.2017).
205. Enterovirus meningitis in Tunisia (Monastir, Mahdia, 2011-2013): identification of virus variants cocirculating in France / Othman I. et al. //

- Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2016. Vol. 84 (2). P. 116—122. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.019 (дата звернення: 25.05.2016).
206. Enterovirus neurological disease and bacterial coinfection in very young infants with fever / Calvo C. et al. // *J. Clin. Virol.* 2016. Vol. 85. P. 37—39. doi: 10.1016/j.jcv.2016.10.020 (дата звернення: 15.06.2017).
207. Etiologies and management of aseptic meningitis in patients admitted to an internal medicine department / Jarrin I. et al. // *Edicine (Baltimore)*. 2016. Vol. 95 (2). 2372 p. doi: 10.1097/MD.0000000000002372 (дата звернення: 28.07.2017).
208. European society of cardiology: cardiovascular disease statistics 2017 / Timmis A. et al. // *Eur. Heart J.* 2018. Vol. 39 (7). P. 508—579. doi: 10.1093/eurheartj/ehx628 (дата звернення: 28.08.2018).
209. Evaluation of an Xpert EV (Cepheid) molecular diagnostic technique for enteroviral meningitis / Perez A. N. et al. // *An Pediatr (Barc)*. 2016. doi: 10.1016/j.anpedi.2016.09.010 (дата звернення: 20.06.2017).
210. Farinha I. T., Miranda J. O. Myocarditis in paediatric patients: unveiling the progression to dilated cardiomyopathy and heart failure // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2016. Vol. 3 (4). P. 1920—1926. doi: 10.3390/jcdd3040031 (дата звернення: 20.06.2017).
211. *Fields Virology*, 7th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA. 2013. 2456 p. www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101601028 (дата звернення: 28.06.2018).
212. Gibson M. S., Domingues N., Vieira O. V. Lipid and non-lipid factors affecting macrophage dysfunction and inflammation in atherosclerosis / *Front. Physiol.* 2018. V. 9. P. 654. doi: 10.3389/fphys.2018.00654 (дата звернення: 25.08.2018).
213. Grose C. Heightened risk of ischemic stroke after recent herpes zoster ophthalmicus // *J. Med. Virol.* 2018. Vol. 90 (8). P. 1283-1284. doi: 10.1002/jmv.25201 (дата звернення: 28.07.2018).

214. Hemorrhagic and ischemic stroke secondary to herpes simplex virus type 2 meningitis and vasculopathy / Snider S. B. et al. // *J. Neurovirol.* 2014. Vol. 20. P. 419—422. doi: 10.1007/s13365-014-0253-7 (дата звернення: 26.08.2017).
215. Herpes zoster as a risk factor for stroke and TIA: a retrospective cohort study in the UK / Breuer J. et al. // *Neurology.* 2014. Vol. 82. P. 206—212.
216. Herpesvirus infections and childhood arterial ischemic stroke: results of the VIPS Study / Elkind M.S. et al. // *Circulation.* 2016. Vol. 133 (8). P. 732—741. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018595 (дата звернення: 28.08.2018).
217. Herpesvirus-induced atherosclerosis in chickens / Fabricant C. G. et al. // *Fed. Proc.* 1983. Vol. 42, № 8. P. 2476—2479.
218. High frequency of human enterovirus species C circulation in Madagascar/ Mala Rakoto-Andrianarivelo et al. // *J. Clin. Microbiol.* 2005. Vol. 43. № 1. P. 242—249.
219. Human parechovirus and enterovirus initiate distinct CNS innate immune responses: pathogenic and diagnostic implications / Fortuna D. et al. // *Clin. Virol.* 2017. Vol. 86. P. 39—45. doi: 10.1016/j.cjv.2016.11.007 (дата звернення: 24.07.2017).
220. Human rhino- and enteroviruses in children with respiratory symptoms in Luanda, Angola / Taipale A. et al. // *Pediatr. Int. Child Health.* 2014. Vol. 34 (2). P. 128—132.
221. Human T-cell leukemia virus-1 infection is associated with atherosclerosis as measured by carotid intima-media thickness in Japanese community-dwelling older people / Yamanashi H. et al. // *Clin. Infect. Dis.* 2018. Vol. 67 (2). P. 291—294. doi: 10.1093/cid/ciy168 (дата звернення: 26.08.2018).
222. IL-27R signaling controls myeloid cells accumulation and antigen-presentation in atherosclerosis / Peshkova I. O. et al. // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7

- (1). P. 2255. doi: 10.1038/s41598-017-01828-8 (дата звернення: 28.07.2017).
223. Immune activation caused by vascular oxidation promotes fibrosis and hypertension / Wu J. et al. // *J. Clin. Invest.* 2016. Vol. 126 (1). P. 50-67. doi:10.1172/JCI80761. (дата звернення: 05.08.2018).
224. Immune-inflammatory activation in acute coronary syndromes: a look into the heart of unstable coronary plaque / Cimmino G. et al. // *Curr. Cardiol. Rev.* 2017. Vol. 13 (2). P. 110—117. doi: 10.2174/1573403X12666161014093812 (дата звернення: 28.08.2018).
225. Immunotherapy for the prevention of atherosclerotic cardiovascular disease: promise and possibilities / Khambhati J. et al. // *Atherosclerosis.* 2018. Vol. 276. P. 1—9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.07.007 (дата звернення: 24.08.2018).
226. Increased plasma IgE accelerate atherosclerosis in secreted IgM deficiency / Tsiantoulas D. et al. // *Circ. Res.* 2017. Vol. 120 (1). P. 78-84. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309606.
227. Induction of cytopathic effect and cytokines in coxsackievirus B3-infected murine astrocytes / Jun Zeng et al. // *Virology Journal.* 2013. Vol. 10. P. 157. doi: 10.1186/1743-422X-10-157 (дата звернення: 2.08.2017).
228. Infections, atherosclerosis, and coronary heart disease / Pothineni N. V. K. et al. // *Eur. Heart. J.* 2017. Vol. 38 (43). P. 3195—3201. doi: 10.1093/eurheartj/ehx362.
229. Infectious and coronary artery disease / Rezaee-Zavareh M. S. et al. // *ARYA Atheroscler.* 2016. Vol. 12 (1). P. 41—49.
230. Infectious burden and atherosclerosis: a clinical issue / Sessa R., Pietro M. D., Filardo S., Turriziani O. // *World J. Clin. Cases.* 2014. Vol. 2 (7). P. 240—249. doi: 10.12998/wjcc.v2.i7.240 (дата звернення: 28.07.2018).
231. Infectious burden and risk of stroke: the Northern Manhattan Study / Elkind M. S. et al. // *Arch. Neurol.* 2010. Vol. 67, № 1. P. 33—38.

232. Infectious causes of stroke. *The Lancet*. / Fugate J. E. et al. // *Infectious diseases*. 2014. Vol. 14 (9). P. 869—880.
233. Influenza vaccination is associated with lower risk of acute coronary syndrome in elderly patients with chronic kidney disease / Chen C.I. et al. // *Medicine (Baltimore)*. 2016. Vol. 95 (5). doi: 10.1097/MD.0000000000002588 (дата звернення: 20.07.2017).
234. Intranasal immunization with recombinant chlamydial protease-like activity factor attenuates atherosclerotic pathology following *Chlamydia pneumoniae* infection in mice / Li W. et al. // *Immunol. Cell. Biol.* 2018. doi: 10.1111/imcb.12192 (дата звернення: 28.08.2018).
235. Intra-plaque hematoma and minor intimal disruption detected by optical frequency domain imaging in a case of acute coronary syndrome / Fukutomi M., Ogata N., Nakano M., Kario K. // *Int. Heart J.* 2016. Vol. 57 (6). P. 760—762.
236. Ischemic stroke across sexes: What is the status quo? / Liberale L. et al. // *Front Neuroendocrinol.* 2018. Vol. 50. P. 3—17. doi: 10.1016/j.yfrne.2018.05.001 (дата звернення: 28.07.2018).
237. Ischemic stroke associated with adenoviral infection in a 4-year-old boy / Kutleza M. et al. // *Wien Klin. Wochenschr.* 2009. Vol. 121. P. 776—779. doi: 10.1007/s00508-009-1286-4 (дата звернення: 28.07.2017).
238. Johnston S. L. G., Siegel C. S. Presumptive identification of enteroviruses with RD, HEp-2 and RMK cell lines // *Journal of clinical microbiology*. 1990. Vol. 28, № 5. P. 1049—1050.
239. Kloc A., Rai D. K., Rieder E. The roles of picornavirus untranslated regions in infection and innate immunity // *Front Microbiol.* 2018. Vol. 9. P. 485. doi: 10.3389/fmicb.2018.00485 (дата звернення: 14.06.2017).
240. Laboratory surveillance of polio and other enteroviruses in high-risk populations and environmental samples / Pogka V. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. Vol. 15, № 5. doi: 10.1128/AEM.02872-16 (дата звернення: 25.07.2017).

241. Laboratory-confirmed respiratory infections as predictors of hospital admission for myocardial infarction and stroke: time-series analysis of English data for 2004–2015 // Blackburn R. et al. // *Clin. Infect. Dis.* 2018. Vol. 67 (1). P. 8—17. doi: 10.1093/cid/cix1144 (дата звернення: 05.09.2018).
242. Lei X., Xiao X., Wang J. Innate immunity evasion by enteroviruses: insights into virus-host interaction // *Viruses.* 2016. Vol. 15. doi: 10.3390/v8010022 (дата звернення: 28.08.2017).
243. Long A., Long B., Koefman A. Non-traditional risk factors for atherosclerotic disease: A review for emergency physicians // *Am. J. Emerg. Med.* 2018. V. 36 (3). P. 494—497. doi: 10.1016/j.ajem.2017.12.036 (дата звернення: 28.08.2018).
244. Majumdar M., Martin J. Detection by direct next generation sequencing analysis of emerging enterovirus D68 and C109 strains in an environmental sample from scotland / *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01956 (дата звернення: 01.09.2018).
245. Manifestations of epidemic process and transmission routes of causative agent of enterovirus serous meningitis / Sergevnin V. I. et al. // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2015. Vol. 6. P. 87—90.
246. McColl B. W., Allan S. M., Rothwell N. J. Systemic infection inflammation and ischemic stroke // *Neuroscience.* 2009. Vol. 158. P. 1049—1061.
247. Mediators between oral dysbiosis and cardiovascular diseases / Pietiäinen M., Liljestränd J. M., Kopra E., Pussinen P. J. // *Eur. J. Oral. Sci.* 2018. Vol. 126, Suppl. 1. P. 26—36. doi: 10.1111/eos.12423 (дата звернення: 25.08.2018).
248. Miller E. C., Elkind M. S. Infection and Stroke: an Update on Recent Progress // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2016. Vol. 16 (1). doi: 10.1007/s11910-015-0602-9 (дата звернення: 27.07.2017).

249. Modulation of phenotype and function of human CD4+CD25+ T regulatory lymphocytes mediated by cAMP-elevating agents / Riccomi A. et al. // *Front Immunol.* 2016. Vol. 20, №7. P. 358-376. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00358
250. Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? / Lukashev A.N. et al. // *Rev. Med. Virol.* 2018. doi: 10.1002/rmv.2002 (дата звернення: 28.08.2018).
251. Molecular epidemiology of enterovirus and parechovirus infections according to patient age over a 4-year period in Spain. / Cabrerizo M. et al. // *J. Med. Virol.* 2017. Vol. 89. P. 435—442.
252. Molecular identification of human enteroviruses associated with aseptic meningitis in Yunnan province, Southwest China / Zhu Y. et al. // *Springerplus.* 2016. Vol. 8, № 5 (1). 1515 p. doi: 10.1186/s40064-016-3194-1 (дата звернення: 28.06.2017).
253. Nagel M. A., Gilden D. The relationship between herpes zoster and stroke // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2015. doi: 10.1007/s11910-015-0534-4 (дата звернення: 25.07.2017).
254. Neutrophil lymphocyte ratios in stroke subtypes and transient ischemic attack / Gukhan S. et al. // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2013. Vol. 17 (5). P. 653—657.
255. New Coxsackievirus B4 genotype circulating in inner Mongolia Autonomous Region, China / Xiaoling Tian et al. // *Plos one.* 2014. Vol. 9 (3). doi: org/10.1371/journal.pone.0090379 (дата звернення: 12.08.2017).
256. Norder H., Magnius L. Can sequence data predict enterovirus D68 infection outcome? // *Lancet. Infect. Dis.* 2015. Vol. 15 (6). P. 620—621. doi: 10.1016/S1473-3099(15)70107-6 (дата звернення: 20.07.2017).
257. Persistence of Coxsackievirus B4 in pancreatic ductal-like cells results in cellular and viral changes / Alidjinou E.K. et al. // *Virulence.* 2017. Vol. 8 (7). P. 1229—1244. doi: 10.1080/21505594.2017.1284735 (дата звернення: 25.07.2018).

258. Persistent coxsackievirus B4 infection induces microRNA dysregulation in human pancreatic cells / Engelmann I., Alidjinou E. K., Bertin A. et al. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2017. Vol. 74 (20). P. 3851—3861. doi: 10.1007/s00018-017-2567-0 (дата звернення: 28.08.2018).
259. Plasma glial fibrillary acidic protein, copeptin, and matrix metalloproteinase-9 concentrations among West African stroke subjects compared with stroke-free controls / Sarfo F. S. et al. // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2018. Vol. 27 (3). P. 633—644. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.09.035 (дата звернення: 25.07.2018)..
260. Progranulin ameliorates coxsackievirus-B3-induced viral myocarditis by downregulating Th1 and Th17 cells / Li L., Li L., Xiao L., Shangguan J. // *Exp. Cell. Res.* 2018. Vol. 367 (2). P. 241—250. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.04.001 (дата звернення: 28.07.2018).
261. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe / Harvala H. et al. // *J. Clin. Virol.* 2018. Vol. 101. P.11—17. doi: 10.1016/j.jcv.2018.01.008 (дата звернення: 26.08.2018).
262. Relative frequency of Echovirus 30 in patients suffering from enterovirus meningitis in Ahvaz / Mojtaba Rasti et al. // *Jundishapur Journal of Microbiology.* 2013. Vol. 6 (2). P. 157—161. doi: 10.5812/jjm.4972 (дата звернення: 28.06.2017).
263. Remmerie A., Scott C. L. Macrophages and lipid metabolism // *Cell. Immunol.* 2018. V. 330. P. 27—42. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.020 (дата звернення: 28.08.2018).
264. Richard S. A. Pivotal pathogenic and biomarker role of Chlamydia Pneumoniae in neurovascular diseases // *Curr. Neurovasc. Res.* 2018. doi: 10.2174/1567202615666180717161807 (дата звернення: 28.08.2018).
265. Risk factors of pediatric arterial ischemic stroke; a regional survey / Ghofrani M. et al. // *Int. J. Prev. Med.* 2018. Vol. 9. P. 69. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM_262_17. (дата звернення: 28.08.2018).

266. Risk of stroke/transient ischemic attack or myocardial infarction with Herpes Zoster: a systematic review and meta-analysis / Zhang Y. et al. // *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2017. Vol. 26 (8). P. 1807—1816. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.04.013 (дата звернення: 28.06.2018).
267. Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in human cytomegalovirus-induced hyperpermeability of human endothelial cells / Tian Y. et al. // *Exp. Ther. Med.* 2018. Vol. 16 (2). P. 1295—1303. doi: 10.3892/etm.2018.6332 (дата звернення: 28.08.2018).
268. Rose N. R. Viral myocarditis // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2016. Vol. 28 (4). P. 383 – 389. doi: 10.1097/BOR.0000000000000303 (дата звернення: 28.07.2017).
269. Rudolph H., Schrotten H., Tenenbaum T. Enterovirus infections of the central nervous system in children: An Update. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016. Vol. 35 (5). P. 567—569. doi: 10.1097/INF.0000000000001090 (дата звернення: 25.08.2017).
270. SCIL-STROKE (subcutaneous interleukin-1 receptor antagonist in ischemic stroke): a randomized controlled phase 2 trial / Smith C. J. et al. // *Stroke.* 2018. Vol. 49 (5). P. 1210—1216. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.020750 (дата звернення: 12.08.2018).
271. Sedmak G., Bina D., MacDonald J. Assessment of an Enterovirus sewage surveillance system by comparison of clinical isolates with sewage isolates from Milwaukee, Wisconsin, collected August 1994 to December 2002 // *Applied and Environmental Microbiology.* 2003. Vol. 69. № 12. P. 7181—7187.
272. Seroprevalence of the newer enterovirus types A71, A90 and B87 in healthy individuals in Shandong Province China / Liu X. L. et. al. // *Bing Du Bao.* 2014. Vol. 30 (6). P. 614—618.
273. Severe enterovirus infections in hospitalized children in the south of England: clinical phenotypes and causative genotypes / de Graaf H. et al. //

- Pediatr. Infect. Dis. J.* 2016. № 35 (7). P. 723—727. DOI: 10.1097/INF.0000000000001093 (дата звернення: 20.07.2017).
274. Spectrum of enterovirus serotypes causing uncomplicated hand, foot, and mouth disease and enteroviral diagnostic yield of different clinical samples / Gao L. et al. // *Clin. Infect. Dis.* 2018. doi: 10.1093/cid/ciy341 (дата звернення: 28.06.2018).
275. Sporadic isolation of sabin-like polioviruses and high-level detection of non-polio enteroviruses during sewage surveillance in seven Italian cities, after several years of inactivated poliovirus vaccination / Battistone A. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. № 80 (15). P. 4491—4501.
276. Study of Coxsackie B viruses interactions with Coxsackie Adenovirus receptor and Decay-Accelerating Factor using Human CaCo-2 cell line / Samira R. et al. // *Journal of Biomedical Science.* 2014. Vol. 21 (1). P. 1—9. doi: 10.1186/1423-0127-21-50 (дата звернення: 25.05.2018).
277. Sudden unexpected death related to enterovirus myocarditis: histopathology, immunohistochemistry and molecular pathology diagnosis at post-mortem / Gaaloul Imed et al. // *BMC Infectious Diseases.* 2012. Vol. 12. Issue 1. P. 7. doi: 10.1186/1471-2334-12-212 (дата звернення: 28.07.2017).
278. Superoxide production by NADPH oxidase intensifies macrophage antiviral responses during diabetogenic coxsackievirus infection / Burg A. R. et al. // *J. Immunol.* 2018. Vol. 200 (1). P. 61—70. doi: 10.4049/jimmunol.1700478.
279. Sustained inflammation 1,5 years post-stroke is not associated with depression in elderly stroke survivors / Nooman K. et al. // *Clin. Interv. Aging.* 2013. Vol. 9. P. 69—74.
280. The association of seropositivity to *Helicobacter pylori*, *C. pneumoniae* and CMV with risk of cardiovascular disease: a prospective study / Haider A. W. et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002. Vol. 40. P. 1408—1413.

281. The quest for new approaches in myocarditis and inflammatory cardiomyopathy / Heymans S., Eriksson U., Lehtonen J., Cooper L.T. Jr. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016. Vol. 68 (21). P. 2348—2364. doi: 10.1016/j.jacc.2016.09.937 (дата звернення: 25.08.2017).
282. The short-and long-term risk of stroke after Herpes Zoster-a nationwide population / Sreenivasan N. et al. // *Based Cohort Study.* 2013. Vol. 8. doi: 10.1371/journal.pone.0069156 (дата звернення: 26.05.2018)
283. Trained innate immunity as a novel mechanism linking infection and the development of atherosclerosis / Leentjens J. et al. // *Circ. Res.* 2018. Vol. 122 (5). P. 664—669. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312465 (дата звернення: 26.08.2018).
284. Trends in age- and sex-specific prevalence and incidence of cardiovascular disease in Western Australia / Sarink D. et al. // *Eur. J. Prev. Cardiol.* 2018. Vol. 25 (12). P. 1280—1290. doi: 10.1177/2047487318786585 (дата звернення: 26.08.2018).
285. Urbanek C., Palm F., Grau A. J. Influenza and stroke risk: a key target not to be missed? // *Infect. Disord. Drug Targets.* 2010. Vol. 10 (2). P. 122—131.
286. Vascular Cell Adhesion Molecule-Targeted MS2 Viral Capsids for the Detection of Early-Stage Atherosclerotic Plaques / Aanei I. L., Huynh T., Seo Y., Francis M. B. // *Bioconjug. Chem.* 2018. Vol. 29 (8). P. 2526—2530. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00453 (дата звернення: 27.08.2018).
287. Virus-induced atherosclerosis / Fabricant C. G. et al. // *J. Exp. Med.* 1978. Vol. 148. №1. P. 335—340.
288. Voorend M., van der Ven A. J. Limited role for C. pneumoniae, CMV and HSV-1 in cerebral large and small vessel atherosclerosis // *Open Neurol. J.* 2008. Vol. 2. P. 39—44.
289. Wieczorek M., Krzysztozek A., Figas A. Molecular characterization of echovirus 30 isolates from Poland, 1995-2015 // *Virus Genes.* 2016. Vol. 52

(3). Р. 400—404. doi: 10.1007/s11262-016-1310-5 (дата звернення: 27.05.2017).