

Серии научно-практических рецензируемых журналов



Медицинский АЛФАВИТ

11 (252) 2015



Modern
LABORATORY

MEDICAL ALPHABET
Russian Professional Medical Journal

Современная ЛАБОРАТОРИЯ том №3

- Фундаментальные основы лабораторной медицины
- Разработка, производство, технологии
- Лабораторное оборудование
- Реагенты
- Новые методы
- Практика
- Экспресс-диагностика
- Организация лабораторной службы
- Конгрессы и конференции

Наш индекс в каталоге «РОСПЕЧАТЬ» 36228

www.medalfavit.ru



Микробиология XXI века MALDI Biotyper®

Система быстрой идентификации микроорганизмов MALDI Biotyper:

- Идентификация микроорганизмов за 1 минуту
- Открытая база данных клинически значимых микроорганизмов (более 2000 видов)
- Простой и удобный пользовательский интерфейс
- Применима для идентификации бактерий, дрожжей и грибов
- Прямая идентификация из биологических жидкостей
- Определение чувствительности к антибиотикам

Для получения более подробной информации и демонстрации систем обращайтесь к нам!

ООО „Брукер“
г. Москва
8(495) 517-9284
8(495) 517-9285

ms.rus@bruker.com
www.bruker.com

MALDI-TOF

Современная лаборатория Том №3

Медицинский алфавит

Серия журналов для специалистов

№ 11 (252) 2015

www.medalfavit.ru

Издатель: издательство медицинской литературы ООО «Альфмед»
Тел.: (495) 616-48-00
E-mail: medalfavit@mail.ru

Учредитель и главный редактор издательства Т. В. Синицка

Почтовый адрес редакции:

129344, г. Москва, ул. Верхоянская, д. 18, к. 2
Тел.: (495) 616-48-00, 221-76-48
E-mail: medalfavit@mail.ru

Главный редактор серии журналов «Медицинский алфавит»
А. С. Ермолов

Редакционный совет журнала «Медицинский алфавит»

В. Г. Акимкин, д.м.н., проф.
А. Ж. Гильманов, д.м.н., проф.
Е. А. Евдокимов, д.м.н., проф.
А. С. Ермолов, д.м.н., проф.
А. А. Кулаков, д.м.н., проф.
Р. Г. Оганов, д.м.н., проф.
В. И. Покровский, д.м.н., проф.
С. А. Рабинович, д.м.н., проф.
В. Е. Синицын, д.м.н., проф.
С. К. Терновой, д.м.н., проф.
Н. В. Шестопапов, д.м.н., проф.
С. Н. Щербо, д.м.н., проф.

Председатель редакционного совета журнала «Медицинский алфавит» серии «Современная лаборатория»: С. Н. Щербо

Руководитель отдела рекламы и маркетинга: Т. Е. Чикмарева
medalfavit@bk.ru

Руководитель отдела продвижения, распространения и выставочной деятельности Б. Б. Будович
medalfavit_pr@bk.ru

Редакция оставляет за собой право сокращения и стилистической правки текста без дополнительных согласований с авторами.
Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов опубликованных материалов.

Редакция не несет ответственности за последствия, связанные с неправильным использованием информации.

Журнал зарегистрирован Министерством РФ по делам печати, теле-, радиовещания и средств массовых коммуникаций.

Рег. номер ПИ № 77-11514 от 04.01.2002

Уст. тираж 12000. Формат А4.

Цена договорная.

При перепечатке ссылка на журнал «МА» обязательна. За содержание рекламы ответственность несет рекламодатель.
За достоверность сведений, изложенных в статьях, ответственность несет автор.

Наш индекс в каталоге «РОСПЕЧАТЬ»
36228 (комплект)

Содержание

- 5 Биомаркеры персонализированной медицины. Часть 5. Некодирующие РНК и микроРНК
С. Н. Щербо, Д. С. Щербо, М. Ю. Кралин
- 12 Опыт управления качеством лабораторных исследований в клинико-диагностической лаборатории Городского консультативно-диагностического центра № 1 г. Санкт-Петербург
М. Н. Остроумова, М. М. Мнускина
- 18 Лабораторная информационная система как инструмент управления процессами лабораторных исследований в медицинской лаборатории многопрофильной клиники
И. Ю. Трегубов, Н. Ю. Голикова
- 20 Информационный поиск и анализ направлений исследований в диссертациях по научной специальности 14.03.10 «клиническая лабораторная диагностика» за 1996–2013 гг.
В. И. Евдокимов, Н. Н. Зыбина, И. Ю. Трегубов, С. В. Скворцов, В. Л. Эммануэль
- 25 Сравнение двух стратегий управления лабораторными назначениями
Т. М. Ивашикина, О. А. Клименкова, В. П. Пашкова, О. Г. Бондаренко, В. С. Берестовская
- 30 Неканонические способы активации тромбоцитов человека
М. С. Макаров
- 37 Экспресс-диагностика нарушений гомеостаза на различных этапах реконструктивных оперативных вмешательств на инфраренальном отделе аорты
А. Н. Грицай, И. А. Сокольников, В. Н. Лапшин, А. В. Щеголев, А. В. Суховецкий
- 42 Тромбин как ключевой фермент гемостаза и его роль в атеросклерозе и воспалении
О. С. Напалкова, В. Л. Эмануэль, С. В. Лапин, М. А. Карпенко, Т. В. Вавилова, Г. А. Березовская, А. Н. Яковлев, Е. Ю. Васильева
- 46 Использование эритроцитарных индексов для скрининга бета-талассемии
Ю. И. Жиленкова, М. Н. Зенина, А. В. Козлов, С. С. Бессмельцев, К. И. Пшеничная, Т. М. Ивашикина
- 51 Нормоальбуминуриновая диабетическая нефропатия: патогенез, биомаркеры, интерпретация
В. В. Вельков
- 64 Метод иммуноблота в диагностике хронической инфекции вируса Эпштейна-Барр
Л. Б. Дрыгина, Т. В. Горейко
- 68 Результаты клинико-лабораторных испытаний иммунофлуоресцентной тест-системы для ранней диагностики гриппа и других ОРВИ
И. В. Амосова, Е. В. Сорокин, Т. Р. Царева, В. Г. Майорова, Е. В. Кузнецова, М. В. Сверлова, Н. А. Соминина, В. Ф. Суховецкая, В. С. Афанасьева
- 74 Подписка

Contents

- 5 *Biomarkers of personalized medicine. Part 5. Non-coding RNAs and microRNA*
S. N. Shcherbo, D. S. Shcherbo, M. U. Kralin
- 12 *Experience of quality management in laboratory studies in clinical diagnostic laboratory of Saint-Petersburg Municipal Consultative and Diagnostic Center No. 1*
M. N. Ostroumova, M. M. Mnuskina
- 18 *Laboratory information system as instrument of management of processes in laboratory researches in medical laboratory*
I. Yu. Tregubov, N. Yu. Golikova
- 20 *Information search and analysis of theses research spheres in specialty 14.03.10 "clinical laboratory diagnostics" (yrs. 1996–2013)*
V. I. Evdokimov, N. N. Zybina, S. V. Skvortsov, V. L. Emmanuel, I. Yu. Tregubov
- 25 *Comparison of two laboratory utilization management strategies*
T. M. Ivashkina, O. A. Klimentkova, V. P. Pashkova, O. G. Bondarenko, V. S. Berestovskaya
- 30 *Non-canonic ways to human platelet activation*
M. S. Makarov
- 37 *Rapid diagnosis of disorders of homeostasis at different stages of reconstructive surgeries on the infrarenal aorta*
A. N. Gritsai, I. A. Sokornov, V. N. Lapshin, A. V. Shchyogolev, A. V. Sukhovetskiy
- 42 *Thrombin as key enzyme of hemostasis and its role in atherosclerosis and inflammation*
O. S. Napalkova, V. L. Emanuel, M. A. Karpenko, T. V. Vavilova, G. A. Berezovskaya, A. N. Yakovlev, V. A. Yudina, E. U. Vasileva, S. V. Lapin
- 46 *Use of red blood cell indices for screening β -thalassemia*
Yu. I. Zhilenkova, M. N. Zenina, K. I. Pshenichnaya, T. M. Ivashkina, A. V. Kozlov, S. S. Bessmeltsev
- 51 *Normoalbuminurinic diabetic nephropathy: pathogenesis, biomarkers, interpretations*
V. V. Velkov
- 64 *Immunoblotting method in diagnosis of chronic Epstein-Barr virus infection*
L. B. Drygina, T. V. Goreyko
- 68 *Results of laboratory testing of immunofluorescence test system for early detection of influenza and other acute respiratory viral infections in hospital condition*
I. V. Amosova, E. V. Sorokin, T. R. Tsareva, V. G. Mayorova, E. V. Kuznetsova, M. V. Sverlova, V. F. Sukhovetskaya, V. S. Afanasyeva, A. A. Sominina
- 74 *Subscription*

С 2008 года журнал «Медицинский алфавит» включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет Импакт-фактор.

В 2015 году научно-практический медицинский рецензируемый журнал «Медицинский алфавит» включен в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и доктора наук (Перечень ВАК).



Председатель редакционного совета
журнала серии «Современная лаборатория» Щербо Сергей Николаевич

Редакционная коллегия

Вавилова Татьяна Владимировна, д. м. н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики и генетики ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Гильманов Александр Жанович, д. м. н., проф., вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, зав. кафедрой биохимии и лабораторной диагностики ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа

Годков Михаил Андреевич, д. м. н., врач высшей категории, рук. отдела лабораторной диагностики ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского», г. Москва

Долгих Татьяна Ивановна, д. м. н., проф., зав. центральной научно-исследовательской лабораторией и руководитель академического центра лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии, г. Омск

Жуковский Александр Васильевич, д. м. н., профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ГОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова», г. Москва

Косырев Александр Борисович, к. м. н., доцент кафедры биохимии ГОУ ДПО «Российская медицинская академия последиplomного образования», г. Москва, ген. директор ООО ТПО «Медиолаб», г. Москва

Падюков Леонид Николаевич, проф. отделения ревматологии медицинского отдела Каролинского института, Стокгольм, Швеция

Первухин Юрий Владиславович, к. м. н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом бактериологии ГОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет», г. Ставрополь

Рысулы Мустафа Рысулович, д. м. н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики Казахского национального медицинского университета имени С. Д. Асфендиярова (КазНМУ), президент Казахской ассоциации медицинской лабораторной диагностики (КАМЛД), г. Алматы, Казахстан

Тарасенко Ольга Анатольевна, д. м. н., проф., зам. генерального директора ФГБУ ВНИИИМТ Росздравнадзора, врач высшей квалификационной категории

Терёхина Наталья Александровна, д. м. н., проф., зав. кафедрой биохимии Пермской государственной медицинской академии им. акад. Е. А. Вагнера, г. Пермь

Шипулин Герман Александрович, к. м. н., рук. отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва

Щербо Сергей Николаевич, д. м. н., проф., вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова», г. Москва

Эмануэль Владимир Леонидович, д. м. н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, директор научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине на базе СПбГМУ им. И. П. Павлова, вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, гл. специалист-эксперт по клинической лабораторной диагностике Росздравнадзора по Северо-Западному федеральному округу, г. Санкт-Петербург

Editorial Board

Vavilova T. V., MD, DMSci, professor, North-Western State Medical University n. a. I. I. Mechnikov, St. Petersburg

Gilmanov A. V., MD, DMSci, professor, Bashkir State Medical University, Ufa

Godkov M. A., MD, DMSci, Research Institute of Emergency Medicine n. a. N. V. Sklifosovsky, Moscow

Dolgh T. I., MD, DMSci, professor, Omsk State Medical Academy, Omsk

Zhukotsky A. V., MD, DMSci, professor, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

Kosyrev A. B., PhD, associate professor, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Mediolab, Moscow

Padyukov L. N., professor of Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

Pervushin Y. N., PhD, professor, Stavropol State Medical University, Stavropol

Rysuly M. R., MD, DMSci, professor, Kazakh National Medical University, president of Kazakh Medical Laboratory Diagnostics Association, Almaty, Kazakhstan

Tarasenko O. A., MD, DMSci Hygiene and Epidemiology Centre, Moscow

Teryokhina N. A., MD, DMSci, professor, Perm State Medical Academy n. a. acad. E. A. Wagner, Perm

Shipulin G. A., PhD, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

Shcherbo S. N., MD, DMSci, professor, Russian National Research Medical University n. a. N. I. Pirogov, Moscow

Emanuel V. L., MD, DMSci, professor, First State Medical University of St. Petersburg n. a. I. P. Pavlov, St. Petersburg

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ НАШЕГО ИЗДАНИЯ!

Важная информация о форме цитирования материалов, опубликованных в журналах серии «Медицинский алфавит»

В связи с требованием РИНЦ об унификации цитирования ссылки на материалы журнала следует оформлять в строгом соответствии с указанным образцом:

Фамилия И. О. Название статьи. // Медицинский алфавит. — Год. — Том X, № X. — С. XX–XX.

Например: Имельбаева Э. А., Гильманов А. Ж. Особенности эритроцитарных антигенов // Медицинский алфавит. — 2014. — Том 2 («Современная лаборатория»), № 12. — С. 14–18.)

Вопросы об оформлении ссылок направляйте, пожалуйста, по адресу medalfavit@mail.ru.

Биомаркеры персонализированной медицины

Часть 5. Некодирующие РНК и микроРНК

С. Н. Щербо, д.м.н., проф., вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики¹

Д. С. Щербо, к.б.н., научный сотрудник¹

М. Ю. Кралин, доцент косметологии и эстетической медицины²

¹ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» (РНИМУ) Минздрава России, г. Москва

²ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), г. Москва

Biomarkers of personalized medicine. Part 5. Non-coding RNAs and microRNA

S. N. Shcherbo, D. S. Shcherbo, M. U. Kralin

The Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov, the People's Friendship University of Russia, Moscow, Russia



С. Н. Щербо



Д. С. Щербо

Резюме

В обзоре рассмотрены роль различных некодирующих РНК в клеточных процессах, биогенез образования микроРНК. Показано, что нуклеотидные последовательности, полиморфизмы, метилирование и изменение концентрации микроРНК могут служить биомаркерами различных заболеваний: онкологических, сердечно-сосудистых, наследственных и др. Обсуждаются возможности создания лекарственных средств на основе антисмысловой РНК.

Ключевые слова: персонализированная медицина, биомаркеры заболеваний, некодирующие РНК, концентрация и полиморфизмы микроРНК, антисмысловая РНК.

Summary

This review describes various noncoding RNAs, their role in subcellular processes and microRNA biogenesis. It is shown that nucleotide sequences, polymorphisms, methylation state and changes in microRNA concentration may serve as biomarkers of various diseases: oncological, cardiovascular and inherited. The development of novel drugs based on antisense RNA is discussed.

Key words: mirRNA, personalized medicine, noncoding RNA, microRNA polymorphism, antisense RNA.

Одним из важнейших событий в биологии прошлого века можно считать открытие молекул информационных (или матричных) РНК (иРНК или мРНК), которые служат посредниками, переносящими информацию из ядра (с хромосом) в цитоплазму. В 1956–57 годах А. Н. Белозерский и А. С. Спириин независимо доказали существование мРНК, а также выяснили, что основную массу РНК в клетке составляет отнюдь не матричная, а рибосомальная РНК (рРНК) [1]. До начала XXI века полагали, что функция РНК ограничена и заключается в генной экспрессии и биосинтезе белка. Генетическая информация реализуется путем экспрессии генов, в процессах транскрипции (синтеза молекул РНК на матрице ДНК) и трансляции (синтеза белков на матрице РНК). Нуклеиновая

последовательность (НП) кодирует информацию о различных типах РНК: мРНК, рРНК) и транспортных (тРНК). Все эти типы РНК синтезируются на основе ДНК в процессе транскрипции [2, 3] и имеют разную роль в биосинтезе белков (процессе трансляции): мРНК содержит информацию о последовательности аминокислот в белке, рРНК служат основой для рибосом (сложных нуклеопротеиновых комплексов, основная функция которых — сборка белка из отдельных аминокислот на основе мРНК), тРНК доставляют аминокислоты к месту сборки белков — активный центр рибосомы. Все тРНК могут либо нести на себе определенный аминокислотный остаток, либо быть свободным от него, причем баланс отражает физиологическое состояние клетки: в условиях аминокислотного

голода увеличивается доля свободных тРНК, при избытке свободных аминокислот практически все тРНК бывают «нагружены». Так как РНК значительно более гидрофильна по сравнению с ДНК (за счет замены дезоксирибозы на рибозу), она более лабильна и может относительно свободно перемещаться в клетке. Однако с гидрофильностью связано и то, что РНК очень нестабильна: намного хуже, чем ДНК, хранится (даже внутри клетки) и деградирует при малейшей перемене условий (температура, рН). В нестабильность большой вклад также вносят рибонуклеазы (или РНКазы) — класс расщепляющих РНК ферментов, очень стабильных и вездесущих, поэтому работать с РНК намного сложнее, чем с белками или ДНК.

В 1993 году В. Амбромс, Р. Ли и Р. Фейнбраум при изучении гена

lin-14 у нематоды *Caenorhabditis elegans* обнаружили, что количество белка LIN-14 регулировалось коротким РНК-продуктом гена *lin-4* [4]. В результате последующих исследований оказалось, что существует достаточно многочисленный класс так называемых малых, некодирующих РНК (нкРНК): *scn*-РНК, *sn*-РНК (класс малых РНК, выявленных в эукариотических клетках; среди них различают РНК-полимеразы второго и третьего типов; которые участвуют в таких важных процессах, как сплайсинг РНК, регулирование факторов транскрипции 7SK) и *spo*-РНК (малые нуклеолярные РНК, которые являются подклассом *sn*-RNA и участвуют в РНК-биогенезе и находятся в эукариотических клетках), *rasi*-РНК, *tasi*-РНК и *natsi*-РНК. Со времени появления технологии глубокого секвенирования открыто большое число нкРНК, которые можно разделить на две группы: малые включающие микроРНК, взаимодействующие с РИWI-белками (*pi*РНК), короткие интерферирующие РНК (*si*РНК) и несколько тысяч представителей длинных РНК (*lnc*РНК) размером от 200 до 100 000 нуклеотидов [5, 6]. Только немногие из малых РНК, например, *pi*-РНК, ответственны за развитие половых клеток, и ни одно млекопитающее мужского пола не может размножаться без них, а другая РНК, названная *XIST*, способна и вовсе «выключить» всю хромосому, что характерно для особей женского пола, поскольку они, в отличие от мужчин, имеют две X-хромосомы. Велика роль коротких РНК в регуляции трансляции, формировании неактивного «молчащего хроматина» и в обеспечении защиты клетки от перемещающихся подвижных элементов (транспозонов). Функционирование «коротких» РНК осуществляется при их комплементарном взаимодействии с цитоплазматическими и ядерными транскриптами по механизму РНК-интерференции (РНКи). Гены выглядят скорее как фабрики по производству РНК и, возможно, что гены, участвующие в биосинтезе белка, в меньшинстве. Согласно полученным данным [7],

количество различных микроРНК у человека может достигать 37 тысяч (при этом 21 тысяча генов, кодирующих белок). В базе данных (БД) (*miRBase*) известно более 2 тысяч микроРНК человека (www.mirbase.org) [8], каждая из которых может регулировать работу сотен генов-мишеней (*TargetScan*, www.targetscan.org). Были созданы: карта генов микроРНК и регулируемых ими генов (*miRNA map*) (mirnamap.mbc.nctu.edu.tw) [8], база данных аннотаций по секвенированию микроРНК [10], базы по сравнению геномов (*coGemiR* [11]) и регуляции микроРНК (*miRGEN* [12]).

МикроРНК (*miRNA*) — это класс малых нкРНК, которые имеют длину около 22 нуклеотидов (18–25) [7, 13, 14], обнаружены у животных (порядка 500), растений и некоторых вирусов, принимают участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. К 2014 году известны более 1 800 микроРНК человека [13] и цифра продолжает расти. Разные клетки и ткани синтезируют отличные наборы микроРНК, поэтому их исследование может привести к выявлению новых биомаркеров [13]. По разным оценкам, мишенями микроРНК являются от 30 до 60% генов человека, кодирующих белок [15]. МикроРНК участвуют в подавлении активности генов: они комплементарно спариваются с участками мРНК и ингибируют их трансляцию. Кроме того, комплексы микроРНК с мРНК часто быстро расщепляются клеткой. Это один из примеров направленной дегградации, так как в основе формирования этих комплексов лежит комплементарность двух молекул РНК. Общее число уникальных мРНК, являющихся мишенями типичной микроРНК, варьирует в зависимости от использованного для оценки метода [16]: по оценкам, мишенями типичной микроРНК могут быть лишь семь мРНК, более поздние оценки были выше [17]. Установлено, что микроРНК позвоночных в общей сложности имеют приблизительно 200 транскриптов-мишеней [18]. Известно также, что одна микроРНК может подавлять обра-

зование сотен белков [19], однако такая репрессия носит относительно умеренный характер (понижение экспрессии менее чем в два раза). Имеются данные, указывающие на возможность взаимодействия микроРНК непосредственно с ДНК в процессе РНК-зависимого метилирования ДНК, которое является одним из ключевых механизмов репрессии генов, аллельного исключения и предотвращения активности транспозонов. Регуляция осуществляется путем гибридационного связывания микроРНК с мишенями — частично комплементарными сайтами в нетранслируемых участках (UTRs) мРНК. МикроРНК кодируются генами, как и все другие виды РНК. Обнаружены микроРНК, разбросанные по разным концам Нох-кластеров, содержащих инструкции о правильном формировании частей тела у многоклеточных в период их эмбрионального развития.

Связывание микроРНК и мРНК является процессом, который определяет уровень мРНК и белка, поэтому наличие полиморфных участков в генах микроРНК и мишеней может выступать в качестве причины развития различных заболеваний человека [16]. Так, в 138 пре-микроРНК описаны 188 однонуклеотидных полиморфизмов (ОМП) [20]. Полиморфизмы в мишенях микроРНК могут стать «золотым прииском» (*gold mine*) для молекулярной эпидемиологии [21].

НкРНК участвуют в процессах роста и развития эукариот, клеточной пролиферации и дифференцировки, апоптоза, эпигенетических модификаций [22], а также задействованы в сложных механизмах контроля и патогенеза рассматриваться как биом различных заболеваний, поэтому могут аркеры заболеваний, лабораторной и ПМ, а также использоваться в терапии [23]. Показано, что изменения экспрессии *spo*РНК и связанных с ними белков могут вносить вклад в развитие ряда заболеваний: аутоиммунных [24], онкологических [25]; уровень их экспрессии изменяется при различных состояниях организма: вирусных инфекциях [26],

хирургическом вмешательстве и др. Длинные lncРНК, вероятно, представляют собой первичный фактор многих мультифакторных заболеваний (МФЗ) человека: сердечно-сосудистых (ССЗ) [27], неврологических, псориаза, лейкоза, рака простаты и толстой кишки и др. [28]

МикроРНК играют важнейшую роль в регуляции метаболизма [29]. Особенно интригующей является информация, что грудное молоко содержит межмолекулярные визикулы с микроРНК, участвующими в формировании иммунной системы младенца [23]: 1 081 микроРНК найдены в липидной фракции грудного молока и 9 074 целевых мРНК, которые идентифицированы для микроРНК [30]. Нарушения в работе микроРНК могут приводить к болезненным состояниям [13, 31]: более 3% генов кодируют микроРНК, которые регулируют более 30% генов человека, включая участвующие в развитии клеточной дифференцировки, устойчивости к стрессу, метаболизме, клеточной пролиферации и апоптозе [32]. Благодаря генетическому контролю многие микроРНК обнаруживают характерные паттерны экспрессии в специфических тканях и типах клеток [33], то есть некоторые виды микроРНК могут влиять на спецификацию и дифференцировку определенного типа клеток [34] (микроРНК-124 у млекопитающих участвует в дифференцировке нейронов [35]). Роль микро-РНК, генов их биогенеза и функционирования в развитии патологических состояний у человека в настоящее время доказана для большого числа разнообразных заболеваний [36]. В связи с этим можно утверждать, что следующим выдающимся событием, которое произошло после открытия существования множества видов РНК, было объяснение природы ряда заболеваний: многих разновидностей рака, некоторых генетически обусловленных заболеваний, инфекционных и многих других. Многие микроРНК принимают активное участие в развитии нервной системы и могут быть связаны с развитием нейродегенеративных заболеваний [37].

Онкологические заболевания

Учитывая спектр регулируемых микроРНК генов, становится очевидным, что нарушения их функционирования могут существенно влиять на все стадии опухолевого процесса от возникновения опухоли до метастазирования [38–40]. В опухолевых клетках изменение экспрессии микроРНК может происходить в результате нарушений (дисрегуляции экспрессии) [41], возникающих как на уровне транскрипции генов микроРНК по механизмам, общим с генами, кодирующими белки, так и на уровне микроРНК-специфического процессинга. Анализ активации или супрессии микроРНК в опухолях различного типа достаточно хорошо исследован [42]. Гены микроРНК, проявляющие свое действие как белок-кодирующие онкогены, можно называть тоже онкогенами (подавляют экспрессию белок-кодирующих генов-онкосупрессоров, например, семейства микроРНК 17–92, 21, 155, 372, 373), а подобно белок-кодирующим генам-онкосупрессорам, соответственно генами-онкосупрессорами (например, микроРНК-15а, 16–1, 34, 143, 145, 200 и let-7, [43]), то есть у первых экспрессия понижена в норме, а у вторых повышена. В результате повышенной экспрессии гена микроРНК-17–92 проявляет себя как онкоген, то есть подавляет активность гена, белок которого должен обеспечить синтез белка-супрессора опухоли или белка, стимулирующего апоптоз опухолевых клеток. Из-за множественного действия некоторые микроРНК проявляются в отдельных случаях как онкогены, в других — как онкосупрессоры рака. Онкоген KRAS является прямой мишенью для микроРНК семейства let-7 [44]. В регуляции синтеза KRAS при раке толстой кишки участвует и микроРНК-143, так в клинических образцах опухоли уровень белка KRAS коррелирует с микроРНК-143. Экспрессия KRAS *in vitro* значительно уменьшается во время обработки прекурсорами микроРНК-143 [45]. Было также обнаружено, что и микроРНК-18а регулирует синтез KRAS в клет-

ках HT-29 аденокарциномы [46]. МикроРНК, действующие как онкогены и опухолевые супрессоры, могут непосредственно участвовать в образовании и развитии многих видов опухолей человека [47].

Использование микроРНК как биомаркеров онкологических заболеваний можно свести к следующим направлениям: ранняя диагностика; определение гистотипа опухоли, выявление различных патоморфологических типов опухолей; стадии развития, дифференцирование доброкачественных опухолей от злокачественных новообразований; потенциал к метастазированию; прогностическое значение в сроках выживаемости; потенциальная терапия; контроль эффекта терапевтического воздействия (лучевая и химиотерапия). Важно, что микроРНК существуют в устойчивых формах в человеческой плазме [48]. МикроРНК-21 (хронологически первая идентифицированная микроРНК) является сильным онкогеном, экспрессия которой увеличивается в большинстве солидных опухолей и увеличивает пролиферативную и инвазивную активность опухолевых клеток. МикроРНК-221, 222 — онкогенные микроРНК, индуцирующие ангиогенез и пролиферацию раковых клеток. Продемонстрировано участие микроРНК-155 в инициации как врожденного, так и адаптивного иммунных ответов, в развитии иммунной системы в целом, а также в онкогенезе различной этиологии.

Ранние раки молочной железы (РМЖ) связаны с увеличением концентрации микроРНК-21 (ингибирует иммуносупрессоры TPM1-тропомизин1, PDCD4-фактор, программирующий гибель клеток) и 155 и уменьшением микроРНК-125b и 145. Причем уровень микроРНК-21 коррелирует со стадией заболевания, метастазами и плохим прогнозом по времени жизни пациентов с РМЖ на поздних стадиях опухолевого процесса. МикроРНК-155, которая обнаружена в крови больных, чувствительных к гормонотерапии, отсутствует в крови больных, не чувствительных к этому виду терапии, и мо-

жет служить маркером-предиктором при выборе терапии. Для РМЖ значительно изменяется паттерн микроРНК: у 13 микроРНК наблюдается повышение экспрессии, а для 49 уровень экспрессии снижен. Специфичность в этом случае составляет 78,8%, а чувствительность 92,5%. Выявление и оценка уровня экспрессии определенных микроРНК в крови становятся важным направлением в диагностике ранних стадий РМЖ. Экспрессия микроРНК-195 повышена в опухолях, а ее количество в крови превышает нормальное в десятки раз. Экспрессия этой микроРНК коррелирует с уровнем экстрагеновых рецепторов. Содержание микроРНК-195 снижается после оперативного вмешательства. Оценка уровня циркулирующих в крови микроРНК-10b, 34a и 155 позволяет дискриминировать больных с метастазирующими опухолями от здоровых людей.

На ранних стадиях развития немелкоклеточного рака легкого (НМЛ) в крови больных существенно повышено содержание микроРНК-21, 125 и 574–5p по сравнению с уровнем в норме [49]. При этом специфичность их определения, то есть выявления именно при этой форме рака легкого, в крови у больных с диагностированным НРЛ составляет 82%, а чувствительность 77%. МикроРНК-155, 197 и 182 в комбинации дают сходные уровни чувствительности и специфичности при использовании метода количественной ПЦР. При НМЛ низкая концентрация микроРНК-324a может служить индикатором плохой выживаемости. В регуляции синтеза KRAS при раке толстой кишки (РТК) участвует и микроРНК-143, так в клинических образцах опухоли уровень белка KRAS коррелирует с микроРНК-143. Экспрессия KRAS *in vitro* значительно уменьшается во время обработки прекурсорами микроРНК-143.

Особый интерес вызывает использование микроРНК в прогнозе метастазирования, в частности, микроРНК-10b и 373. Высокая концентрация микроРНК-185 или низкая микроРНК-133b свидетельствуют о наличии метастазов и, следова-

тельно, плохой выживаемости при раке толстой и прямой кишки. Известны 18 микроРНК, которые считаются индикаторами прогрессии опухолей печени. Профиль трех микроРНК (9, 182 и 200b) может определять агрессивность опухолей мочевого пузыря. В то же время микроРНК-205 является супрессором опухолевого роста, и было показано, что в случае некоторых видов опухолей она индуцирует апоптоз и тормозит рост опухоли. Семейство микроРНК-183 предлагается в качестве многообещающего биомаркера для ранней диагностики, точного прогноза онкологических заболеваний, а также для более эффективного лечения. МикроРНК-7 обладает свойствами антиметастатической микроРНК при опухолях желудка в результате взаимодействия с мРНК, кодируемой геном рецептора инсулиноподобного ростового фактора (IGF-R).

Одним из механизмов регуляции генов микроРНК является метилирование CpG-островков их промоторных участков, которое может определяться с применением метилспецифичной ПЦР. Показано отсутствие метилирования промоторных CpG-островков генов микроРНК-107 и 130b при НРЛ, и выявлены корреляции частоты метилирования генов микроРНК-125b-1 и 137 с показателями прогрессии заболевания. Обнаружена связь частоты метилирования ряда генов микроРНК с показателями прогрессии светлоклеточного почечноклеточного рака (размером опухоли, стадией, потерей дифференцировки, образованием метастазов) [49, 50]. Для эпителиальных опухолей легкого, толстой кишки, РМЖ и других органов построены профили метилирования генов микроРНК, которые полезны для диагностики и прогноза развития заболевания [51]. В различных опухолях, таких как карцинома легкого и РМЖ, происходит сверхэкспрессия lncРНК, а lncРНК HOTAIR является точным предиктором метастазов при опухолях молочной железы. Методом ПЦР РВ показано, что микроРНК-21, 155, 222 и 10b являются кандидатами в качестве биомаркеров для РМЖ [52].

Сердечно-сосудистые заболевания

Прямое клонирование и исследование профиля экспрессии позволили идентифицировать в тканях сердца большое количество микроРНК [53], которые необходимы, в частности, для его развития [54], а уровни экспрессии определенных микроРНК меняются при различных заболеваниях, свидетельствуя тем самым об их вовлеченности в патогенетические изменения при кардиомиопатии [55]. МикроРНК служат важнейшими факторами кардиогенеза, гипертрофированного роста и сердечной проводимости [56]. Две микроРНК-1 и 21 могут рассматривать как причинные при нескольких патологических состояниях сердечно-сосудистой системы, в том числе при сердечной недостаточности и гипертрофии сердца (наряду с микроРНК 23a, 133a, 195, 208, 208a). При использовании метода гибридизации *in situ* было показано, что микроРНК-21 селективно экспрессируется в фибробластах сердца, и ее экспрессия регулирует сигнальный каскад MAP-киназ, молекул межклеточного матрикса в фибробластах. МикроРНК-21 активизирует MAP-киназы, ингибируя экспрессию гена *Spry1* (sprout homolog 1). С использованием молекулярных микрочипов было показано, что микроРНК-29 предпочтительно экспрессируется в фибробластах, что ведет к уменьшению повреждения миокарда.

Показана ассоциация микроРНК-155 при гипертонии, микроРНК-145 и 21 — при заболевании сосудов, микроРНК-17–5p, 20a — при легочной гипертензии. Пять микроРНК — 18b, 221, 222, 424 и *let-7f-2* — локализованы на X-хромосоме, поэтому число копий таких микроРНК различается у мужчин и женщин, что определяет гендерные различия в возникновении и развитии ССЗ. Атеросклероз является системной, хронической патологией, сопровождающейся развитием эндотелиальной дисфункции при активном вовлечении в процесс воспалительного и иммунного компонентов [57]. Среди большого числа микроРНК, уча-

ствующих в регуляции воспалительных процессов, особое внимание заслуживают микроРНК-21 и 146. Одним из основных блокаторов воспалительной активности генов является микроРНК-21, активация которой угнетает выработку фактора некроза опухоли, а также активируются интерлейкины 6 и 13.

Обнаружены полиморфные варианты в генах микроРНК, которые ассоциированы с ССЗ и в большинстве случаев локализованные в пре-микроРНК и в участках связывания с мРНК: в гене микроРНК-125a rs12975333, а микроРНК-499 rs3746444. МикроРНК-155, как указано выше, регулирует экспрессию гена рецептора первого типа к ангиотензину II (AGTR1) на трансляционном уровне [58] (причем специфически снижается уровень экспрессии только мРНК с аллельным вариантом 1166A, но не 1166C [59]). Известно, что эффективность работы микроРНК может определяться наличием ОНП в сайтах связывания на мРНК генов-кандидатов заболеваний сердечно-сосудистой системы. В 3'UTR гена AGTR1 описана замена A1166C (rs5186), влияющая на функциональную активность рецептора (аллель 1166C обуславливает его повышенное сродство к ангиотензину II) [60]. Показана ассоциация ОНП с ССЗ: гипертонией [61] и гипертрофией левого желудочка [62].

Сердечная недостаточность является основной причиной госпитализации в пожилом возрасте. Используемые в настоящее время лекарственные препараты лишь временно смягчают симптомы этого заболевания, не улучшают функцию сердца и не останавливают прогрессирование болезни. Было показано, что путем блокирования микроРНК-25 антисмысловой РНК можно затормозить этот процесс. При сердечной недостаточности происходит подавление гена SERCA2a, который регулирует поступление кальция в клетки сердечной мышцы и важен для сократительной функции сердца. Способность сердца сокращаться регулируется поступлением кальция, и что при сердечной недостаточности

активность кальциевого насоса SERCA2a снижается. Используя высокопроизводительную систему скрининга, проведен скрининг 875 микроРНК, и найдена микроРНК-25, которая мощно подавляла поглощение кальция клетками сердца. У пациентов с сердечной недостаточностью активируется микроРНК-25, а введение антисмысловой РНК, блокирующей микроРНК-25, улучшает функцию и повышает выживаемость. Молекула антисмысловой РНК — последовательность, комплементарная конкретной молекуле РНК, называемой в этом случае «смысловой», которую она инактивирует. Проблемами являются доставка антисмысловой РНК в клетки сердечной мышцы, где находятся ее мишени и строгие правила FDA. При системном введении антисмысловых препаратов они хорошо накапливаются в печени, почках, жировых клетках, макрофагах и значительно хуже в сердце.

Другие заболевания

МикроРНК регулируют работу генов, связанных с развитием многих неврологических заболеваний [63] и играют регуляторную роль в нервной системе, а проведенные исследования выявили несколько различных механизмов указанной регуляции [64]. Нейронные микроРНК вовлечены в различные этапы формирования нейронных связей (микроРНК-124, 132 и 134), образование синапса и его созревания. Полиморфизм микроРНК ассоциируется с синдромом Тауретта [65], а полиморфизм rs12720208 в области 3'-UTR для фактора роста фибробластов 20 (FGF20) идентифицирован как фактор риска при болезни Паркинсона, нарушение комплементарности в сайте присоединения микроРНК433 приводит к увеличению экспрессии FGF20 [66].

Шизофрения является психическим заболеванием с генетической предрасположенностью, которое дает целый кластер микроРНК-127, 134, 136, 154, 342, 345 [67], а для микроРНК-59 и 430 (гиппокампус) уменьшается экспрессия. Несколько

ОНП присутствуют в генах кодирующих микроРНК-206, 198 и 30e [68], изменение концентрации которых в тканях ассоциируется с заболеванием шизофренией. С системной болезнью Альцгеймера ассоциированы мутации в белках пресенилин 1 и пресенилин 2, β -амилоид расщепляющем белке (BACE1), и заболевание имеет свой паттерн микроРНК-9, 125b, 146a [69].

Группой микроРНК, регулирующих инсулинорезистентность и вовлеченных в развитие ожирения и диабета, является семейство let-7. Let-7 накапливается в тканях по мере старения. Подавление let-7 может не только предотвращать развитие диабета и ожирения, но и использоваться для лечения этих заболеваний. Поэтому подавление let-7 может стать новым средством лечения ожирения и диабета второго типа. Концентрация микроРНК-133b в различных отделах мозга у больных паркинсонизмом и у здоровых людей различаются: содержание этой специфической микроРНК в среднем мозге у больных людей возрастает [70].

Наследственные заболевания

Найдена связь микроРНК и некоторых наследственных заболеваний, в частности, нейросенсорной глухотой [71]. Так, мутация в затравочном «seed-регионе» (то есть связывающемся с мРНК, соответствующим 2–7 нуклеотидам зрелой микроРНК [72]) микроРНК-96 вызывает наследственную прогрессирующую потерю слуха [73]. Комплекс микроРНК с белком Argonaute, соединившись с мРНК-мишенью, вызывает обычно деградиацию этой мРНК при комплементарном взаимодействии [74]. Мутация, затрагивающая seed-регион микроРНК-184, приводит к развитию наследственного катарактоноса, которому предшествует полярная катаракта [75]. Делеция микроРНК-17 вызывает дефекты роста и развития скелета [76]. При болезни Геттингтона отмечено уменьшение экспрессии микроРНК-9/микроРНК-9*, 29b, 124 и увеличении экспрессии микроРНК-132 [77]. Известны примерно десять различ-

ных мышечных дистрофий, при которых в биологических образцах наблюдается изменение большого пула (до 185) различных микроРНК, в частности, микроРНК-146b, 155, 214, 221 и 222 изменяют свою концентрацию при миодистрофиях Дюшена и Бекера [78].

Контролируя экспрессию различных генов, микроРНК, безусловно, сами находятся под генетическим контролем. Так, ген Мус, с одной стороны, регулируется с помощью микроРНК, а с другой стороны, контролирует ряд микроРНК, включая микроРНК-141, 200, 249, важных для программ самообновления стволовых клеток. Кроме того, контролируемые им микроРНК-17-5p и 20a негативно регулируют транскрипционный фактор E2F1. Четыре основных транскрипционных фактора, необходимых для предопределения качественных особенностей стволовых клеток (Oct4, Sox2, Nanog и TcO), регулируют в целом активность 81 зрелой микроРНК [79]. Для многих белков, уровень которых повышается в клетке, подвергшейся стрессу, определенную роль играет микроРНК-223. Большинство регулируемых микроРНК-223 белков участвуют в обнаружении и реакции на глутамат — химический сигнал, используемый мозгом в межклеточной коммуникации. Инсульт или травмы наряду с целым рядом других заболеваний, таких как аутизм и болезнь Альцгеймера, могут привести к опасному избытку глутамата в головном мозге. Так как микроРНК-223 вовлечена в регуляцию синтеза такого большого количества различных белков, а также оказывает влияние на рецепторы глутамата, которые тоже участвуют во множестве различных процессов, область воздействия этой молекулы оказалась гораздо шире, чем ожидалось.

Недавно опубликованная работа [80] является частью большого проекта GEUVADIS (Genetic European Variation in Health and Disease, Европейские генетические вариации в здоровье и при заболеваниях), в рамках VII Рамочной программы Европейской комиссии (50 человек- участников). Авторы

исследования провели секвенирование мРНК и микроРНК 462 человек, принадлежащих пяти различным популяциям, по которым были известны данные НП по программе тысячи персональных геномов. Получены уникальные данные по индивидуальному широкому разбросу активности генов, свидетельствующие о чрезвычайной перспективности указанного класса биомаркеров для лабораторной и ПМ. Высокая специфичность делает микроРНК удобным инструментом диагностики различных заболеваний, однако мультифакторность воздействия микроРНК, по-видимому, пока не позволяет использовать в полной мере их в качестве терапевтического средства.

Список литературы

1. Спирин А. С. Биосинтез белков, мир РНК и происхождение жизни. // Вестник РАН. — 2001. — 71. — С. 320–328.
2. Hooper-McGrevy K.E., MacDonald B., Whitcombe L. Quick, simple, and sensitive RNA quantitation. // *Anal. Biochem.* — 2003. — 318. — 2. — P. 318–320.
3. Bellacosa A., Moss E. G. RNA repair: damage control. // *Curr. Biol.* — 2003. — 13. — 12. — R482–484.
4. Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. // *Cell.* — 1993. — 75. — 5. — P. 843–854.
5. Huang Y., Wang J. P., Yu L. et al. Молекулярные функции малых регуляторных некодирующих РНК. // *Биохимия.* — 2013. — 78. — 3. — С. 303–313.
6. Huang Y., Wang J. P., Yu X. L. et al. Некодирующие РНК и болезни. // *Молекулярная биология.* — 2013. — 47. — 4. — С. 531–543.
7. Danish S., Maha A. MicroRNAs in development and disease. // *Physiol. Rev.* — 2011. — 91. — P. 827–887.
8. Griffiths-Jones S., Saini H. K., van Dongen S. et al. miRBase: tools for microRNA genomics. // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — 36. — D154–D158.
9. Betel D., Wilson M., Gabow A. et al. The microRNA.org resource: targets and expression. // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — 36. — D149–D153.
10. Yang J. H., Shao P., Zhou H. et al. deepBase: a database for deeply annotating and mining deep sequencing data. // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — 38. — D123–D130.
11. Maselli V., Di Bernardo D., Banfi S. CoGemiR: a comparative genomics microRNA database. // *BMC Genomics.* — 2008. — 9–457.
12. Alexiou P., Vergoulis T., Gleditsch M. et al. miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation. // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — 38. — D137–D141.

13. Mishra P. J. MicroRNA polymorphisms: a giant leap towards personalized medicine. // *Per. Med.* — 2009. — 6. — 2. — P. 119–125.
14. Barel D. P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. // *Cell.* — 2009. — 23. — 136. — 2. — P. 215–233.
15. Peterson S. M., Thompson J. A., Ufkin M. L. et al. Common features of microRNA target prediction tools // *Front Genet.* — 2014. — 5. — P. 23.
16. Thomson D. W., Bracken C. P., Goodall G. J. Experimental strategies for microRNA target identification. // *Nucleic Acids Res.* — 2011. — 39. — 16. — P. 6845–6853.
17. John B., Enright A. J., Aravin A. et al. Human MicroRNA targets. // *PLoS Biol.* — 2004. — 2. — 11. — e363.
18. Krek A., Grün D., Poy M. N. et al. Combinatorial microRNA target predictions. // *Nat. Genet.* — 2005. — 37. — 5. — P. 495–500.
19. Selbach M., Schwanhäusser B., Thierfelder N. et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. // *Nature.* — 2008. — 455. — 7209. — P. 58–63.
20. Friedländer M. R., Lizano E., Houben A. J. et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. // *Genome Biol.* — 2014. — 4. — 15. — C. R57.
21. Lewis B. P., Burge C. B., Bartel D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. // *Cell.* — 2005. — 120. — 1. — P. 15–20.
22. Макарова Ю. А., Иванова С. М., Тоневицкий А. Г. и др. Новые функции малых ядрышковых РНК. // *Биохимия.* — 2013. — 78. — 6. — С. 825–839.
23. Zhou Q, Li M, Wang X et al. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. // *Int. J. Biol. Sci.* — 2012. — 8. — P. 118–123.
24. Ender C., Krek A., Friedlander M. R. et al. A human snoRNA with microRNA-like functions. // *Mol. Cell.* — 2008. — 32. — 4. — P. 519–528.
25. Mannoor K., Liao J., Jiang F. Small nucleolar RNAs in cancer. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2012. — 1826. — 1. — P. 121–128.
26. Sakharov D. A., Maltseva D. V., Riabenko E. A. et al. Passing the anaerobic threshold is associated with substantial changes in the gene expression profile in white blood cells. // *Eur. J. Appl. Physiol.* — 2012. — 112. — 3. — P. 963–972.
27. Кучер А. Н., Бабушкина Н. П. Роль микроРНК в развитии заболеваний сердечно-сосудистой системы. // *Молекулярная медицина.* — 2012. — С. 10–17.
28. Gutschner T., Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. // *RNA Biol.* — 2012. — 9. — P. 703–719.
29. Nolte-'t Hoen E. N. M., Van Rooij E., Bushnell M. The role of microRNA in nutritional control. // *J. Internal Medicine.* — 2015. — 278. — 2. — P. 99–109.
30. Munch E. M., Harris R. A., Mohammad M. et al. Transcriptome profiling of microRNA by Next-Gen deep sequencing reveals known and novel miRNA species in the lipid fraction of human breast milk. // *PLoS One.* — 2013. — 8. — e50564.
31. Zhu H., Fan G-Ch. Role of micro RNAs in the reperused myocardium towards post-infarct remodeling. // *Cardiovascular Res.* — 2012. — 94. — 284–292.

32. Friedman R. C., Farh K. K., Burge C. B. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. // *Genome Res.*— 2009.— 19.— 1.— P. 92–105.
33. Landgraf P., Rusu M., Sheridan R., et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. // *Cell.*— 2007.— 129.— P. 1401–1414.
34. Lu L. F., Liston A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. // *Immunology.*— 2009.— 127.— P. 291–298.
35. Cheng L. C., Pastrana E., Tavazoie M. et al. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. // *Nat. Neurosci.*— 2009.— 12.— P. 399–408.
36. Кучер А. Н., Бабушкина Н. П. Роль микро-РНК, генов их биогенеза и функционирования в развитии патологических состояний у человека. // *Мед. генетика.*— 2011.— 1.— С. 3–13.
37. Kaur P., Armugam A., Jeyaseelan K. MicroRNAs in neurotoxicity. // *J. Toxicol.*— 2012.— 870150.
38. Jansson M. D., Lund A. H. MicroRNA and cancer. // *Molecular Oncology.*— 2012.— 6.— 6.— P. 590–610.
39. Hayes J., Peruzzi P. P., Lawler S. MicroRNA in cancer: biomarkers, functions and therapy. // *Trends Mol. Med.*— 2014.— 20.— 8.— P. 460–469.
40. Ryan B. M., Robles A. I., Harris C. C. Genetic variation in microRNA networks: implications for cancer research. // *Nat. Rev. Cancer.*— 2010.— P. 389–402.
41. Chen C.— Z. MicroRNA as oncogenes and tumor suppressors. // *N. Engl. J. Med.*— 2005.— 353.— P. 1768–1771.
42. Dykhor D. M. MicroRNA and metastasis: little RHAs go a long way. // *Cancer Res.*— 2010.— 70.— P. 6401–6406.
43. Griffiths-Jones S., Enright A. J., Farazi T. A. et al. MicroRNA research. // *The 2008 Collection booklet: Exiqon.*— 2008.— P. 36.
44. Johnson S. M., Grosshans H., Shingara J. et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. // *Cell.*— 2005.— 120.— P. 635–647.
45. Chen X., Guo X., Zhang H. et al. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. // *Oncogene.*— 2009.— 28.— P. 1385–1392.
46. Tsang W. P., Kwok T. T. The miR-18a* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-RAS. // *Carcinogenesis.*— 2009.— 30.— P. 953–959.
47. Nikitina E. C., Urazova L. N., Stegny V. N. MicroRNA and human cancer. // *Exp. Oncol.*— 2012.— 34.— P. 2–8.
48. Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 2008.— 105.— 30.— P. 10513–10518.
49. Zhou M., Guo M., He D. et al. A potential signature of eight long non-coding RNAs predicts survival in patients with non-small cell lung cancer. // *J. Translational Medicine.*— 2015.— 13.— P. 231.
50. Береснева Е. В., Рыков С. В., Ходырев Д. С. и др. Профиль метилирования группы генов микроРНК при светлоклеточном почечноклеточном раке; связь с прогрессией рака. // *Генетика.*— 2013.— 49.— 3.— С. 366–375.
51. Рыков С. В., Ходырев Д. С., Пронина И. В. и др. Новые гены микроРНК, подверженные метилированию в опухолях легкого. // *Генетика.*— 2013.— 49.— 7.— С. 896–901.
52. Zhang Q. H., Sun H. M., Zheng R. Z. et al. Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues. // *Gene.*— 2013.— 527.— 1.— P. 26–32.
53. Cheng Y., Ji R., Yue J. et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? // *Am. J. Patol.*— 2007.— 170.— P. 1831–1840.
54. Chen J. F., Murchison E. P., Tang R. et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*— 2008.— 105.— 6.— P. 2111–2116.
55. Thum T., Galuppo P., Wolf C. et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. // *Circulation.*— 2007.— 116.— 3.— P. 258–267.
56. Zhao Y., Samal E., Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. // *Nature.*— 2005.— 436.— 7048.— P. 214–220.
57. Son D. J., Kumar S., Takabe W. et al. The atypical mechnosensitive microRNA-712 derived from pre-ribosomal RNA induces endothelial inflammation and atherosclerosis. // *Nature Communications.*— 2013.— 4.— 3000.
58. Martin M. M. et al. MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type I receptor expression in fibroblasts. // *J. Biol. Chem.*— 2006.— 281.— 18277–18284.
59. Martin M. M. et al. The human angiotensin II type I receptor +1166A/C polymorphism attenuates microRNA-155 binding. // *J. Biol. Chem.*— 2007.— 282.— P. 224262–224269.
60. Van Geel P. P. et al. Is the A1166C polymorphism of the angiotensin II type I receptor involved in cardiovascular disease? // *Eur. Heart J.*— 1998.— 19 (suppl. 1).— P. G13–G17.
61. Palatini P. et al. Angiotensin II type I receptor gene polymorphism predicts development of hypertension and meta syndrome. // *Am. J. Hypertens.*— 2009.— 22.— 2.— P. 208–214.
62. Amir O et al. Relationship between AT1R gene polymorphism and long-term outcome in patients with heart failure. // *Cardiology.*— 2009.— 112.— 2.— P. 151–157.
63. McNeill E., Van Vactor D. MicroRNAs shape the neuronal landscape. // *Neuron.*— 2012.— 75.— P. 363–379.
64. Fabian M. R., Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. // *Nat. Struct. Mol. Biol.*— 2012.— 19.— P. 586–593.
65. Abelson J. F., Kwan K. Y., O'Roak B. J. et al. Sequence variants in *SLITRK1* are associated with Tourette's syndrome. // *Science.*— 2005.— 310.— P. 317–320.
66. Wang G., van der Walt J. M., Mayhew G. et al. Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of α -synuclein. // *Am. J. Hum. Genet.*— 2008.— 82.— P. 283–289.
67. Seitz H., Poyo H., Bortolin M. L. et al. A large imprinted microRNA gene cluster of the mouse *Dlk1-Gtl2* domain. // *Genome Res.*— 2004.— 14.— P. 1741–1748.
68. Hansen T., Olsen L., Lindow M. et al. Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology. // *PLoS One.*— 2007.— 2.
69. Sethi P., Lukiw W. J. MicroRNA abundance in human brain: specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex. // *Neurosci Lett.*— 2009.— 459.— P. 100–104.
70. Kim J., Inoue K., Ishii J. et al. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. // *Science.*— 2007.— 317.— 5842.— P. 1220–1224.
71. Мглинец В. А. Нейросенсорная глухота. Генетические нарушения микроРНК. // *Медицинская генетика.*— 2012.— 2.— С. 10–18.
72. Lewis B. P., Burge C. B., Bartel D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. // *Cell.*— 2005.— 120.— P. 15–20.
73. Mencía A., Modamio-Høybjør S., Redshaw N. et al. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for non-syndromic progressive hearing loss. // *Nat. Genet.*— 2009.— 41.— 5.— P. 609–613.
74. Guo H., Ingolia N. T., Weissman J. S. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. // *Nature.*— 2010.— 466.— P. 835–840.
75. Hughes A. E., Bradley D. T., Campbell M. et al. Mutation Altering the miR-184 Seed Region Causes Familial Keratoconus with Cataract. // *The American Journal of Human Genetics.*— 2011.— 89.— 5.— P. 628–633.
76. de Pontual L., Yao E., Callier P. et al. Germline deletion of the miR-1792 cluster causes skeletal and growth defects in humans. // *Nat. Genet.*— 43.— 1.— P. 1026–1030.
77. Packer A. N., Xing Y., Harper S. Q. et al. The bifunctional microRNA miR-9/mir-9* regulated in Huntington's disease. // *J. Neurosci.*— 2008.— 28.— P. 4341–4346.
78. Greco S., De Simone M., Colussi C. et al. Common microRNA signature in skeletal muscle and Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. // *FASEB J.*— 2009.— 23.— P. 3335–3346.
79. Marson A., Levine S. S., Cole M. F. et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. // *Cell.*— 2008.— 134.— P. 521–533.
80. Hoen P. A. C., Friedlander M. R., Almlöf J. et al. Reproducibility of high-throughput mRNA and small RNA sequencing across laboratories. // *Nature Biotechnol.*— 2013.— 31.— P. 1015–1022.





М. Н. Остроумова

Опыт управления качеством лабораторных исследований в клинично-диагностической лаборатории Городского консультативно-диагностического центра № 1 г. Санкт-Петербург



М. М. Мнускина

М. Н. Остроумова, д.б. н., врач КДЛ, отвечающий за качество
М. М. Мнускина, зав. КДЛ

СПБ ГБУЗ «Городской консультативно-диагностический центр № 1»,
г. Санкт-Петербург

Experience of quality management in laboratory studies in clinical diagnostic laboratory of Saint-Petersburg Municipal Consultative and Diagnostic Center No. 1

M. N. Ostroumova, M. M. Mnuskina

The Municipal Consultative and Diagnostic Center №1, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

В статье описывается опыт создания системы контроля качества в лаборатории Городского консультативно-диагностического центра Санкт-Петербурга. Ошибки в лабораторных исследованиях существенно снижаются при введении в практику ЛИС, вакуумных систем для забора крови, определения сывороточных индексов. Аналитическое качество создается в процессе взаимодействия внутрилабораторного и регулярного внешнего контроля. Приводятся результаты многолетнего участия лаборатории в программах ЭКВАС. Стандартизация всех процессов должна быть отражена в документе СМК по ИСО 15189.

Ключевые слова: контроль качества, стандартизация, программы ЭКВАС.

Summary

The article describes the experience of creating a system of quality control in the laboratory of the Municipal Consultative and Diagnostic Center in St. Petersburg. Errors in laboratory studies are significantly reduced with the introduction into practice of LIS, vacuum systems for blood sampling, determination of serum indices. Analytical quality is created during the interaction intralaboratory and regular external control. We present the results of many years of laboratory participation in EQAS programs. Standardization of all processes should be reflected in the document of the SMQ in accordance with ISO 15189.

Key words: quality control, standardization, EQAS program.

Создание качества в работе лаборатории — особый процесс. Каждый сотрудник, отвечающий за свои результаты, обычно владеет всеми приемами контроля качества. Кроме того, имеется выделенный специалист, отвечающий за управление и организацию качества работы по КДЛ в целом. В его обязанности входит координация работы так называемого «совета по качеству», в котором представлены все подразделения лаборатории. Финансовые и организационные вопросы, важные для поддержания должного качества (оборудование и его модернизация, закупки реагентов и контрольных материалов, подбор кадров и многое другое), решает заведующая лабораторией.

В настоящий момент в лаборатории ведется работа над руководством по системе менеджмента

качества на основе стандарта ISO 15189–2012. Оно содержит основной документ и обширные приложения. Полезную информацию и помощь в создании этих документов можно найти в работах А. В. Эмануэля и созданном им сайте [1–3]. Мы находим эту работу весьма полезной, так как вскрываются пробелы и недостатки, устранение которых необходимо для совершенствования качества предоставления лабораторных услуг.

Создание и особенно улучшение системы менеджмента качества — длительный и непрерывный процесс. Задачей настоящей публикации является анализ некоторых итогов по созданию системы управления качеством работы лаборатории, мероприятий, снижающих количество ошибок на пре- и постаналитиче-

ском этапе, а также принятого у нас алгоритма аналитического этапа исследований.

Структура лаборатории, основное оборудование и материалы

Межрайонная централизованная клинично-диагностическая лаборатория нашего центра обслуживает все отделения ГКДЦ № 1 и 15 амбулаторно-поликлинических учреждений Выборгского, Калининского и Приморского районов города. Состоит из четырех отделов:

1. отдел биохимических, иммунохимических и коагулологических исследований оборудован двумя биохимическими модулями с501 Cobas 6000 (Roche), двумя иммунохимическими модулями e601 Cobas 6000 (Roche), STA-R Evolution (Stago), ACL-TOP (Instrumentation Laboratory);

2. отдел иммунологических исследований работает на иммунохимическом анализаторе Architect 2000i (Abbott) и анализаторе для аллерготестирования Phadia 250 (Pharmacia Diagnostic);
3. отдел гематологических, общеклинических и цитологических исследований оборудован двумя гематологическими анализаторами Sysmex XT-2000, мочевыми станциями URISIS 2400 (Roche) и UF-1000i (Sysmex), иммуногематологическим автоанализатором AutoVue (Ortho-Clinical Diagnostics);
4. отдел молекулярно-генетических исследований оснащен ПЦР-анализаторами, работающими в режиме реального времени: TagMan 48 (Roche) и CFX 96 (Bio-Rad).

На преаналитическом этапе используются станция пробоподготовки и сортировки пробирок Cobas p-312 (Roche), а также система пробоподготовки ПЦР-анализа Freedom EVO 100/4 (TECAN).

Для централизованной обработки данных контрольных материалов используется модуль контроля качества лабораторной информационной системы PSM-АКЛ (Roche-Акросс Инжиниринг).

Внутрилабораторный контроль качества осуществляется с использованием «независимых» контрольных материалов производства Bio-Rad (трехуровневый контроль для иммунохимических и коагулологических исследований, двухуровневый контроль для биохимических тестов). Контрольные материалы фирмы Roche («родные» контроли) мы покупаем в редких случаях, как правило, для новых тестов.

Внешний контроль качества проводится в нескольких программах ФСВОК (в основном по качественным или полуколичественным тестам) в программах EQAS (Bio-Rad, США): ежемесячные программы по биохимии, иммунохимии, гликированному гемоглобину, биохимии мочи и гематологии; в двух программах RIQAS (Randox, Великобритания) по коагулологии и моче на полосках.

Преаналитический этап

По статистике больше половины ошибок совершаются на преаналитическом этапе. Имеются международные и отечественные стандарты и рекомендации [4–9], на основе которых нами разработаны внутренние стандарты проведения преаналитического этапа, в том числе:

- инструкции, содержащие необходимую для врача-клинициста информацию о перечне анализов с указанием необходимости предварительной подготовки пациента перед взятием крови или сбора мочи;
- инструкции для среднего медицинского персонала по забору биоматериала, транспортировке, обработке, идентификации и хранению;
- введена единая форма бланка-заявки;
- взятие проб крови во всех процедурных кабинетах происходит с помощью закрытых вакуумных систем в специализированные пробирки с нужным наполнителем для проведения биохимических, гематологических, коагулологических исследований, определения СОЭ; в последнее время добавились пробирки с фторидом натрия для определения глюкозы в плазме крови у беременных. Для сбора мочи, в том числе суточной, используются специальные пластиковые контейнеры;
- определяются сывороточные индексы для выявления степени гемолиза, иктеричности или мутности (липемичности) и, соответственно, анализа их возможного влияния на искажение результатов анализа. Определение сывороточных индексов снизило количество отказов в приеме визуально гемолизированных образцов, так как в процессе анализа каждой сыворотки степень гемолиза можно определить количественно. Пользуясь специальными таблицами [9], мы принимаем решение указать на возможное завышение или занижение результата или рекомендовать повторное исследование;
- внедрены лабораторная информационная система (ЛИС) и штрих-кодирование образцов.

Задачей **аналитического этапа** является правильное выполнение всех исследований с тем, чтобы выданные пациенту анализы были достоверны, соответствовали международным стандартам, были сравнимы с исследованиями в других лабораториях.

В современной лаборатории вклад аналитического этапа в количество ошибок минимален и составляет менее 10 процентов. Это связано с оснащением лаборатории высокоточными автоматическими анализаторами, разработкой подробных алгоритмов проведения аналитического этапа ведущими мировыми и российскими специалистами [4, 10–1], регулярным участием в программах внешней оценки качества.

С учетом своих возможностей каждая лаборатория разрабатывает и устанавливает собственные принципы и правила ведения контроля качества, целью которых является получение надежных результатов исследований, которым доверяют врачи и пациенты. Далее предлагается один из вариантов подхода к этой проблеме.

Необходимо определить требования к аналитическому качеству. У нас эти требования основаны на биологических вариациях каждого аналита [10–12]. В международной базе данных, которые можно найти на сайте Westgard [13], указаны индивидуальные и групповые биологические вариации каждого аналита и рекомендации по максимальной величине смещения и воспроизводимости. Эту информацию можно найти и в других доступных изданиях, но на сайте Westgard она периодически обновляется, появляются новые аналиты. В своей работе мы стараемся соблюдать эти критические характеристики.

Ежегодно в каждом подразделении заполняются так называемые таблицы аналитического качества, их удобно составлять по окончании лота контрольного материала, при этом выбирается один из уровней контроля, наиболее близкий к принятию клинического решения (табл. 1). В этих таблицах имеются сведения о требованиях к максимальной воспроизводимости и максимальному смещению, собственные реальные

Таблица 1
Шаблон аналитической таблицы

Аналит	Аналитическое качество, в процентах						Sigma	
	Рекомендуемое			Реально полученное лабораторией				Планируемый CVa
	CVmax	Bmax	TEmax	CVa	Ba	TEa		
	Из таблиц по биологическим вариациям	Из прибора	Среднее смещение из ВОК	Расчет	На основе достижимого	Расчет		
1.								
2.								
3.								

воспроизводимость и смещение, общая ошибка, рассчитываются сигма и планируемая воспроизводимость на основе достижимой величины. Предлагаемая таблица удобна также тем, что в ней имеются все необходимые показатели для расчета важной в практическом отношении величины RCV (Reference Change Value) критической разницы — показателя статистически клинически значимого различия при динамическом наблюдении за анализом в процессе лечения или наблюдения за пациентом. Она зависит от внутрииндивидуальной биологической вариации и аналитической воспроизводимости и вычисляется по формуле:

$$2,8 \times \sqrt{(CVi^2 + CVa^2)}.$$

Поскольку таблицы составляются регулярно, можно проследить динамику качества исследований во времени, анализировать причины изменений работы оборудования, заметить момент, когда прибор необходимо заменить.

Практика работы с аналитическими таблицами показывает, что ключевым моментом в планировании ВЛК является воспроизводимость, которая характеризуется коэффициентом аналитической вариации (CVa). Необходимо хорошо знать собственные CVa, сопоставлять их с воспроизводимостью, заявленной производителем, отслеживать ее динамику. Важно иметь длительные наблюдения за воспроизводимостью (не меньше 50 определений), с тем, чтобы сюда вошли различные события, включающие калибровку, замену лота реагентов и калибраторов, профилактические мероприятия и т. д.

В табл. 2 можно видеть три подхода к планированию разброса значений контрольного материала. Для аналитов с широкими биологическими колебаниями (или сигмой больше шести) мы планируем CVmax, составляющий половину от величины, рекомендуемой в соответствующих таблицах как базовая (оптимальный уровень точности).

Для аналитов со средними CVa планируем CVmax, составляющие половину индивидуального CVi (базовый уровень точности). Наконец, имеются проблемные аналиты, определение которых не удается выполнить с требуемой воспроизводимостью, для них устанавливаются реально достижимые CVa. Как правило, это аналиты с очень узкими биологическими вариациями (натрий, хлор, кальций, альбумин, гликированный гемоглобин, ионизированный кальций). Но бывают и исключения: так, например, для микроальбумина не удалось снизить планируемый разброс, так как первый уровень контрольной мочи относительно плохо воспроизводится. В разные годы список проблемных аналитов может меняться. Это зависит в первую очередь от обновления оборудования, а также лотов реагентов и калибраторов, технического обслуживания.

Проведение ВЛК позволяет получить представление о воспроизводимости каждого аналита

Таблица 2
Примеры планирования качества определения аналитов с различными биологическими вариациями

Аналит	Из таблиц по биологическим вариациям		CVmax на основе достижимого	CVa реальные
	CVi	CVmax		
С широкими вариациями				
АЛТ	19,6	9,8	4,9	2,5
Билирубин общий	22,0	11,0	5,5	3,2
Микроальбумин	36,0	18,0	18,0	12,6
Со средними вариациями				
Холестерин	6,0	3,0	3,0	1,3
Глюкоза	5,6	2,8	2,8	1,4
Креатинин	6,0	3,0	3,0	1,9
Проблемные аналиты				
Кальций	2,1	1,1	1,6*	1,2*
Натрий	0,6	0,3	1,5*	1,0*
Альбумин	3,1	1,6	2,0*	1,7*

и лишь частично о правильности его определения. Итоговая точность определяется по результатам ВОК. В этом отношении важно, чтобы используемая программа ВОК была регулярной (не реже одного раза в месяц), с возможно бóльшим количеством лабораторий-участников конкретных программ, с адекватными и достаточными группами сравнения.

Начиная с 2005 года, лаборатория непрерывно участвует в нескольких программах ВОК EQAS (Bio-Rad, США), в том числе «Ежемесячная клиническая химия крови», «Ежемесячная иммунохимия», в специальных программах по гематологии, биохимии мочи, гликированному гемоглобину. По окончании каждого цикла координационный центр рассылает заключительный отчет, где суммируется выполнение всех тестов в 12 ежемесячных контрольных образцах. Интерес к изучению своих рейтингов у нас возник с первого участия в программе по иммунохимии в 2005 году, когда лаборатория заняла первое место среди всех участников и первое место среди лабораторий России, принявших участие в данном цикле. Особенностью этого цикла было то обстоятельство, что работа в основном проводилась на новом, только что установленном приборе.

Из табл. 3 видно, как из года в год увеличивалось число лабораторий, участвующих в программах EQAS в мире и в России. Наша лаборатория, как правило, входит в число 10 процентов лучших лабораторий в программах по биохимии и иммунохимии и в число 20 процентов в программе по гематологии среди участников программ EQAS.

В специальных отчетах по окончании цикла координационный центр информирует своих пользователей, на каком оборудовании работают 10, 20 и 50 процентов лучших лабораторий. Это делается для того, чтобы помочь менеджерам ориентироваться на рынке лабораторной техники.

В последующем координационный центр ВОК EQAS видоизменил свои годовые отчеты. Все участники

Название программы ВОК ЭКВАС	Годы выполнения	Место лаборатории (в скобках количество участников)	
		Все лаборатории	Лаборатории России
Ежемесячная иммунохимия: гормоны, витамины, онкомаркеры. Всего 28 тестов			
Цикл 2	2005	1 (228)	1 (28)
Цикл 3	2006	29 (333)	1 (47)
Цикл 4	2007	186 (579)	11 (58)
Цикл 5	2008	50 (792)	3 (73)
Цикл 6	2009	263 (860)	15 (86)
Цикл 7	2010	14 (1104)	1 (80)
Цикл 8	2011	10(1253)	2 (80)
Ежемесячная биохимия крови: всего 27 тестов			
Цикл 4	2005–2006	57 (943)	1 (46)
Цикл 5	2006–2007	79 (1421)	3 (85)
Цикл 6	2007–2008	74 (1718)	3 (106)
Цикл 7	2008–2009	18 (2320)	1 (131)
Цикл 8	2009–2010	72 (2532)	3 (123)
Цикл 9	2010–2011	100 (2808)	4 (132)
Цикл 10	2011–2012	103 (3123)	3 (89)
Гематология два раза в месяц, всего 10 параметров			
Цикл 1	2008–2009	44 (272)	7 (30)
Цикл 2	2009–2010	78 (398)	2 (30)
Цикл 3	2010	104 (516)	9 (40)
Цикл 4	2010	161 (701)	12 (63)
Цикл 5	2010–2011	81 (725)	7 (56)
Цикл 6	2011	109 (878)	4 (50)

программ теперь делятся по качеству результатов на пять подгрупп, одна из которых называется «лучшая» (Best). В зависимости от конкретной программы в нее входят от 3 до 30 процентов участников. За немногими исключениями, мы входим в группу «Best» среди всех лабораторий и среди участников из лабораторий России. Таким образом, по результатам ВОК работу лаборатории можно считать вполне удовлетворительной и стабильной, что важно для **постаналитического этапа**.

На этом этапе результаты клинических лабораторных исследований используются обычно для *диагностики*: обнаружения заболевания на основании изучения симптомов и проведения соответствующих лабораторных исследований; *скрининга*, направленного на выявление

скрытых заболеваний у практически здоровых людей и *мониторинга* — сравнения результатов исследований пациента, полученных на протяжении некоторого промежутка времени. Для решения всех трех задач большое значение имеют стандартные требования и процедуры постановочного этапа:

- предоставление отчетов с проверенными результатами и правильными референсными интервалами. Они разрабатываются и устанавливаются производителями тест-систем и, при необходимости, с использованием авторитетных справочников;
- своевременное выполнение анализов. Недопущение задержки выдачи результатов;
- хранение первичных образцов после анализа в течение семи суток (архив проб). Архив востребован

для выполнения недостающих анализов по просьбе клиницистов или сотрудников лаборатории;

- обязательные консультации по всем аспектам лабораторной деятельности, по интерпретации результатов;
- своевременное сообщение о критических и тревожных результатах по телефону, иногда непосредственно лечащему врачу. Как правило, это делает сотрудник регистратуры, ведущий записи в специальном журнале. Сообщаются критические значения уровня трансаминаз, глюкозы, креатинина, калия, МНО, вирусных инфекций.

Тесную связь с клиницистами осуществляют сотрудники группы гемостаза в специализированном консультативном антикоагулянтном кабинете, куда немедленно поступают сведения о значениях МНО (Международное нормализованное отношение). Не выходя из диагностического центра, пациенты не только получают быстрый лабораторный результат, но и консультацию специалиста-кардиолога по коррекции терапии.

Несколько научно-исследовательских групп из различных НИИ Санкт-Петербурга сотрудничают с нашей лабораторией, публикуются совместные статьи в научных журналах, выполняются диссертационные работы, в том числе врачами нашего центра.

В 2015 году сотрудница нашей лаборатории О. О. Белявская защитила кандидатскую диссертацию на тему «Маркеры активации свертывания крови у амбулаторных больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями». Среди новых важных данных по оценке панели гиперкоагуляции получен весьма интересный и необходимый для постаналитического этапа факт о целесообразности пересчета верхней границы референтного интервала значений Д-димера у пожилых пациентов. Это привело к снижению числа лиц старше 50 лет, имеющих уровень Д-димера выше референтного интервала, в том числе пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Коррекция в соответствии с возрастом нормального

уровня Д-димера позволила у 10 процентов больных безопасно отменить терапию варфарином без развития тромбозомболических осложнений [14–15].

Заключение

Безусловно, важнейший фактор успешной работы современной лаборатории — хорошее и постоянно обновляющееся оборудование. Использовать это оборудование необходимо согласно стандартно прописанным процедурам на всех этапах лабораторного процесса: преаналитическом, аналитическом и постаналитическом. Ключевыми моментами, существенно влияющими на качество исследований, являются введение лабораторной информационной системы (ЛИС), забор крови с использованием вакуумных систем, определение сывороточных индексов.

Создание надежного аналитического качества начинается с установки требований к воспроизводимости во внутреннем контроле при работе с «независимыми» контрольными материалами. Они определяются в соответствии с представлениями о биологических вариациях или на основе достижимого и обязательно указываются в соответствующих аналитических таблицах. Необходимо, чтобы истинные значения каждого аналита во внутреннем контроле постоянно уточнялись в процессе регулярного участия в программах внешнего контроля.

Стабильные и в основном правильные результаты лаборатории в нескольких программах внешнего контроля показывают надежность наших определений, повышают рейтинг лаборатории среди врачей и всех других пользователей.

Работа антикоагулянтного кабинета оказалась удачной формой взаимодействия лаборатории гемостаза с кардиологами диагностического центра.

Перспективы мы видим в дальнейшей стандартизации всех процессов. Предстоит еще большая работа по созданию документа «Система менеджмента качества» в соответствии с международным стандартом ISO 15189.

Список литературы

1. Эмануэль А. В. Технология создания руководства по качеству для медицинской лаборатории в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 15189 и ГОСТ Р ИСО 9001. // Справочник заведующего КДЛ. — 2011. — № 11. — С. 57–68.
2. Эмануэль А. В. Технология создания руководства по качеству для медицинской лаборатории в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 15189 и ГОСТ Р ИСО 9001. // Справочник заведующего КДЛ. — 2011. — № 12. — С. 3–13.
3. <http://15189.ru>.
4. Мошкин А. В., Долгов В. В. Обеспечение качества в клинической лабораторной практике. — М., 2004.
5. Мошкин А. В. Индекс гемолиза как индикатор качества внелабораторной части преаналитического этапа лабораторного исследования. // Клиническая лабораторная диагностика. — 2012. — № 11. — С. 63–64.
6. Plebani M. Quality Indicators to Detect Preanalytical Errors in Laboratory Testing. // Clin. Biochem. Rev. — 2012. — Vol. 39. — P. 85–88.
7. Долгих Т. И. Закрытие вакуумные системы для взятия венозной крови: вопросы стандартизации и безопасности. // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. — 2013. — № 1. — С. 60–63.
8. ГОСТ Р 53079.4–2008. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.
9. Сывороточные индексы: сокращение ошибок в лабораторной медицине. URL: Roche_diagnostics.ru/date/serum_indices.pdf.
10. Фрейзер Каллум Г. Биологическая вариация: от теории к практике. — М., 2010.
11. Арефьева И. А., Моченова Н. Н., Мошкин А. В. Требования к аналитическому качеству: использование концепции биологической вариации. // Клиническая лабораторная диагностика. — 2009. — № 11. — С. 3–7.
12. Арефьева И. А., Федорова М. М., Мошкин А. В. Планирование аналитического качества количественных лабораторных исследований с использованием коммерческих контрольных материалов. Методические рекомендации. Москва, 2013.
13. www.Westgard.com
14. Белявская О. О., Вавилова Т. В., Бекоева А. Б. Д-димер у амбулаторных пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. — 2015. — № 1. — С. 49–51.
15. Белявская О. О. Уровень Д-димера у пожилых пациентов в амбулаторной практике. // Лаборатория. — 2015. — № 2. — С. 12.



Надежность и безопасность в лабораторном секторе



- Взрывобезопасный объем для хранения взрывчатых и легковоспламеняемых веществ соответствует требованиям АTEX 95
- Электронный блок управления позволяет точно задать температуру хранения
- Наличие сигнализации: в случае изменения температуры или незакрытой двери, пропадания питания по сети (визуальная)
- Интегрированная регистрация и хранение данных по min\max температуре, случаях срабатывания сигнализации и пропадания питания
- RS 485 интерфейс и безпотенциальные контакты для дополнительной регистрации данных по температуре и сигнализации
- 1 точка калибровки обеспечивает точный контроль температуры хранения.



ООО «Либхерр-Русланд»
123104 Москва, Большой Палашевский пер. д. 13/2
+7 (495) 280-03-27, +7 (495) 280-03-76,
+7 (495) 280-03-28
www.lab.liebherr.com

LIEBHERR

Качество, дизайн и инновации



И. Ю. Трегубов



Н. Ю. Голикова

Лабораторная информационная система как инструмент управления процессами лабораторных исследований в медицинской лаборатории многопрофильной клиники

И. Ю. Трегубов, врач клинической лабораторной диагностики, специалист по качеству отдела лабораторной диагностики¹

Н. Ю. Голикова, руководитель проектов по лабораторным информационным системам²

¹ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова» (ВЦЭРМ) МЧС России, г. Санкт-Петербург

²Компания «СП.АРМ», г. Санкт-Петербург

Laboratory information system as instrument of management of processes in laboratory researches in medical laboratory

I. Yu. Tregubov, N. Yu. Golikova

The All-Russian Center for Emergency and Radiation Medicine n.a. A. M. Nikiforov; SP. APM Co., St.-Petersburg, Russia

Тенденции модернизации и развития отечественной системы здравоохранения в целом и клинической лабораторной диагностики, в частности, диктуют свои решения всем сопутствующим задачам, в том числе и информационным. Этот факт весьма значим, так как одним из приоритетных направлений, представленных в программе развития здравоохранения Российской Федерации, является организация информационной поддержки деятельности медицинских учреждений [1].

Путь развития, по которому движется российская лабораторная медицина, направлен на централизацию исследований. Это подразумевает, наряду с созданием «фабрик» с высокопроизводительными автоматическими аналитическими системами, использование современных методов их информационной поддержки. Речь идет о лабораторных информационных системах (ЛИС).

ЛИС первого поколения были впервые разработаны и внедрены в 1982 году. Сейчас мы имеем дело с их пятым поколением. С момента первого запуска коммерческой лабораторной системы принципиальных изменений в логике построения как самой лаборатории, так и информационного отражения не появилось. Это прежде всего связано с жесткой структурой и последовательностью самого лабораторного исследования. Начиная с последней четверти прошлого века и по настоящее время, жизненный цикл анализа и порядок его проведения определяют три основных процесса: преаналитический, аналитический, постаналитический. В неизменном виде они существуют и сегодня.

Возникает резонный вопрос: если сохраняются существующие подходы, то что мы, собственно, хотим изменить, и к чему можно (необходимо) стремиться?

Не вызывает сомнений утверждение, что эффективность работы клинической лаборатории существенно влияет как на диагностику заболеваний, так и на ре-

зультат лечения. Чем выше качество лабораторных исследований (снижение количества ошибок, обеспечение качества биологического материала, уменьшение ошибок в запросах, сокращение времени обработки результата и т. д.), тем увереннее принимает решение лечащий врач.

С целью улучшения критериев оценки деятельности лаборатории рабочей группой IFCC [2] была предложена новая версия стандарта ИСО 15189:2012, в которой акцент делается на процессном управлении, и подробно описываются индикаторы качества, относящиеся к результативности процессов.

В рамках нашего рассмотрения мы сопоставили среднестатистические значения индикаторов, отражающих качество лабораторных исследований до внедрения в практику систем информационной поддержки, и результаты, полученные нами после ввода в эксплуатацию лабораторной информационной системы qMS в отделе лабораторной диагностики Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова. Исследования проводились в период с 2010 по 2015 год.

Некоторые критерии из приведенного выше стандарта [2] оказались в нашем случае неактуальными. Дело в том, что при идентификации пациента, заполнении формы запроса, идентификации образца, в ЛИС qMS используются решения, не допускающие самой возможности возникновения ошибок. Частично это связано с внедрением системы штрихкодирования биологических образцов, которое позволило фактически исключить вероятность отсутствия или нечитабельности данных пациента на контейнере с биоматериалом.

В то же время явились крайне востребованными и показательными индикаторы процессов, связанных со взятием биологического материала, транспортировкой и выбраковкой первичных проб. Использование ЛИС позволило проанализировать каждый из описанных выше

процессов благодаря жесткой временной привязке всех событий с возможностью сопоставления интервалов от одной операции до другой: назначение исследования, забор биоматериала, маркировка пробирок, передача назначений в лабораторию, прием, сортировка и обработка образцов, выполнение исследований, подтверждение корректности результата врачом лаборатории, оформление (печать) результатов и отправка бланков ответов лечащему врачу.

В сочетании с привязкой каждого события к конкретному исполнителю анализ временных интервалов позволяет оптимизировать логистику проведения анализов и выявить «узкие» места. У каждой ошибки и задержки появляется свой автор, с которым можно проводить целенаправленную разъяснительную работу. В частности, оценив структуру ошибок на этапе забора биологического материала и выявив наиболее значимые составляющие [3], лабораторная служба ВЦЭРМ добилась значительного снижения процента ошибок на преаналитическом этапе путем работы с медицинским персоналом.

Еще одним резервом повышения эффективности работы лаборатории является возможность совместной (пользователь — заказчик) модернизации функциональных возможностей ЛИС. Так, например, по постановкам ВЦЭРМа компания «СП.АРМ» реализовала в своей информационной системе qMS процедуру выбраковки первичной пробы пациента на основе критериев оценки проб, поступивших на исследование. Проведенные на основе этого функционала корректирующие меропр-

ятия также положительно сказались на качестве исследований. Не менее полезными оказались и результаты работы модуля контроля качества с соответствующими аналитическими срезами внутри самой лаборатории.

Так как основной массив лабораторных результатов формируется автоматическими анализаторами, повысить эффективность этого этапа работы, казалось бы, невозможно. Однако и здесь автоматическое отслеживание сроков действия калибровок и периодичность проведения контроля качества, позволяют добиться улучшения качества результата.

Сегодня лабораторная информационная система это не просто инструмент автоматизации. Она становится элементом управления и оптимизации всех без исключения процессов лабораторного исследования. Встроенные в ЛИС qMS аналитические инструменты позволяют не только использовать уже предложенные критерии качества, но и разрабатывать свои собственные, проводя их оперативный мониторинг в режиме реального времени руководителями разного уровня (отдела, лаборатории или медицинской организации в целом).

Список литературы

1. Государственная программа Российской Федерации «Развитие здравоохранения» 2013–2020 г.
2. Эммануэль А. В. «Особенности новой версии стандарта ИСО 15189:2012». // Справочник заведующего КДЛ.— 2015, № 5.— с. 7–12.
3. Трегубов И. Ю. «Опыт внедрения системы менеджмента качества в медицинской лаборатории многопрофильной клиники на примере использования ЛИС». // Медицинский алфавит.— 2014. № 12. Современная лаборатория № 2, с. 45–46.



Информационные системы для медико-социальной сферы

Компания «СП.АРМ»

197227, г. Санкт-Петербург, ул. Гаккелевская, д.21,
тел.: (812) 944 54 17, факс: (812) 777 50 93
e-mail: info@sparm.com, www.sparm.com





В. И. Евдокимов

Информационный поиск и анализ направлений исследований в диссертациях по научной специальности 14.03.10 «клиническая лабораторная диагностика» за 1996–2013 гг.



Н. Н. Зыбина

В. И. Евдокимов, д.м.н. проф.¹
Н. Н. Зыбина, д.б.н., проф., зав. отделом лабораторной диагностики¹
И. Ю. Трегубов, специалист по качеству отдела лабораторной диагностики¹
С. В. Скворцов, д.м.н., проф., гл. специалист направления «лабораторное дело»²
В. Л. Эммануэль, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины³



И. Ю. Трегубов

¹ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Россия, г. Санкт-Петербург
²ЗАО «Группа компаний МЕДСИ», г. Москва
³ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Information search and analysis of theses research spheres in specialty 14.03.10 “clinical laboratory diagnostics” (yrs. 1996–2013)

V. I. Evdokimov, N. N. Zybina, S. V. Skvortsov, V. L. Emmanuel, I. Yu. Tregubov

The All-Russia Center for Emergency and Radiation Medicine n.a. A. M. Nikiforov (EMERCOM), Saint-Petersburg; MEDSI Co., Moscow; the First Saint-Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, Saint-Petersburg, Russia



В. Л. Эммануэль

Резюме

Научная специальность 14.00.46 «клиническая лабораторная диагностика» введена в Номенклатуру специальностей научных работников в 1995 году. По этой специальности было разрешено представлять в диссертационные советы работы по биологическим и медицинским отраслям науки. В 2010 году специальности присвоен новый шифр 14.03.10. Представлен алгоритм поиска материалов диссертационных исследований в электронных базах данных ведущих

библиотек, официальных сайтов учреждений, при которых созданы диссертационные советы, и ВАК Минобрнауки России. Сравнение фондов хранения библиотек позволило создать массив из 444 авторефератов диссертаций за 1996–2013 годы. Они составили около 0,5% от суммы всех биологических и медицинских диссертаций в России. Полиномиальный тренд динамики количества диссертаций по клинической лабораторной диагностике при коэффициенте детерминации $R^2 = 0,84$ напоминает пологую инвертируемую U-кривую с максимальными показателями в 2004–2009 годах. Ежегодно в диссертационные советы представлялись по 28 ± 3 диссертации, в том числе докторских по 5 ± 1. Медицинских работ было 85,7%, биологических 14,3%. Докторские диссертации составили 17,2%, кандидатские 82,8%. Отмечаются увеличение количества вклада медицинских диссертаций и стабилизация соотношений докторских и кандидатских диссертаций. На стыке наук (по двум специальностям) были выполнены 58,3% диссертаций. Анализ структуры направлений научных исследований паспорта специальности показал, что основы теории клинической лабораторной диагностики (первое направление) проводились в 30% диссертаций, химические исследования биологических жидкостей (второе) в 11,1%, морфологические (цитологические) исследования биоматериала (третье) в 6,6%, иммунологические исследования (четвертое) в 16,7%, микробиологические исследования (пятое) в 8,5%, цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследований (шестое) в 4,1%, методы лабораторной диагностики (седьмое) в 10,3%, основы организационного обеспечения клинической лабораторной диагностики (восьмое) — в 2,7%. Указаны мероприятия по созданию единой базы данных полнотекстовых материалов диссертаций на электронных носителях и интеграции отечественных исследований в мировое научное сообщество.

Ключевые слова: клиническая лабораторная диагностика, науковедение, информационный поиск, диссертация, диссертационный поток, диссертационный совет, библиотеки, Высшая аттестационная комиссия России.

Summary

Comparing leading libraries stocks has allowed creating a collection of 444 theses abstracts in special field 14.03.10 (14.00.46) “Clinical Laboratory Diagnostics” over the period of 1996–2013. They constitute about 0.5% of total biological and medical theses in Russia. Annually theses boards receive 28 ± 3 theses including Doctoral theses 5 ± 1. Doctoral theses constitute 17.2%, Candidate theses — 82.8%, medical theses — 85.7%, biological theses — 14.3%, theses at the intersection of disciplines (in two specialties) — 58.3% of total theses collection. Structure analysis of theses research spheres of the specialty has shown the following: clinical laboratory diagnostics theory basics (1st research sphere) was in 30% of theses, biological liquids chemical research (2nd sphere) in 11.1%, morphological (cytological) research of biomaterial (3rd sphere) in 6.6%, immunology research (4th sphere) in 16.7%, microbiological research (5th sphere) in 8.5%, cytogenetic and molecular genetics research methods (6th sphere) in 4.1%, methods of laboratory diagnostics (7th sphere) in 10.3%, basics of organizational provision of clinical laboratory diagnostics (8th sphere) in 2.7%. There stated measures on creating a unified database of full text theses materials on electronic data storage devices and integration of national research into the world scientific community.

Keywords: Clinical laboratory diagnostics, Science of Science, information search, thesis, dissertation stream dissertation council, libraries, State Commission for Academic Degrees and Titles of Russia.

Введение

Институт присвоения ученых степеней в Российской империи связывают с указом Екатерины II о создании Медицинской коллегии (09.06.1764). Первым доктором наук стал Г.М. Орреус, который получил образование в Петербургской госпитальной школе (ныне корпус Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург). В 1765 году он публично защитил диссертацию, однако из-за бюрократической волокиты диплом доктора медицины получил только в 1768 году после личного обращения к императрице Екатерине II [1]. В 1794–1917 годах в Российской империи дипломы доктора наук получили только 4078 человек [2].

В 1918 году постановлением Совета народных комиссаров СССР ученые степени и ученые звания были отменены. Только спустя 15 лет в 1934 году в СССР, а затем и в Российской Федерации было решено присваивать ученые степени кандидата наук и доктора наук. В 1937–1991 годах в диссертационных советах СССР были рассмотрены 90 830 докторских и 835 037 кандидатских диссертаций [2], в 1992–2013 годах в Российской Федерации — 79 198 и 467 342 соответственно.

Отрасль науки, по которой представляется в ученый совет диссертация, соотносится с Номенклатурой специальностей научных работников, а содержание — с паспортом научной специальности. Научная специальность 14.00.46 «клиническая лабораторная диагностика» введена в номенклатуру приказом Миннауки России от 28.02.1995 № 24. Разрешено представлять в диссертационные советы работы по биологическим и медицинским отраслям науки. В 2010 году в номенклатуру введены новые шифры специальностей по некоторым биологическим и медицинским наукам, и пересмотрены паспорта научных специальностей. Специальности «клиническая лабораторная диагностика» был присвоен новый шифр 14.03.10 [3].

Клиническая лабораторная диагностика — научная специальность, занимающаяся разработкой лабораторных методов объективного химического и морфологического анализа биологических материалов (жидкостей, тканей, клеток) человеческого организма; оценкой с помощью этих методов

состояния органов, физиологических систем организма и их резервных возможностей; выявлением отклонений от нормы и патологических нарушений в деятельности органов, систем организма человека; установлением диагнозов болезней и осуществлением лабораторного контроля за динамикой патологического процесса, результатами лечения и реабилитации. Совершенствование методов клинической лабораторной диагностики будет способствовать правильной диагностике и эффективности лечения заболеваний, обеспечивать сохранение здоровья населения, сокращение сроков временной нетрудоспособности и реабилитации заболевших [4].

Цель исследования — выявить оптимальный алгоритм поиска материалов диссертационных работ по специальности 14.03.10 «клиническая лабораторная диагностика» и провести анализ направлений научных исследований.

Материал и методы

Объект исследования составили электронные базы данных ведущих библиотек страны: Российской государственной библиотеки (РГБ), Российской национальной библиотеки (РНБ), Центральной научной медицинской библиотеки (ЦНМБ) и официальные сайты учреждений, при которых созданы диссертационные советы, и ресурс «Объявления о защите докторских диссертаций» ВАК Минобрнауки России.

Предметом исследования стали материалы диссертационных исследований (авторефераты и диссертации) по специальности 14.03.10 (14.00.46) «клиническая лабораторная диагностика» в России (1996–2013 годы).

На основании положений федерального закона «Об обязательном экземпляре документов» [5], которые нашли отражение в основных нормативных документах по подготовке научных кадров, опубликованные авторефераты диссертаций направляются в ведущие библиотеки страны, входящие в состав учреждений реферативно-библиографического обслуживания государственной системы научной и технической информации России, а диссертации

на бумажном носителе — в Российскую государственную библиотеку (РГБ). С 2000 года диссертации по медицинским и фармацевтическим наукам должны направляться в Центральную научную медицинскую библиотеку (ЦНМБ). Однако годовые фонды хранения материалов диссертаций указанных библиотек могут значительно различаться. Причин несколько. Основными являются недостатки каталогизации и непоступление работ в библиотеки. При анализе потоков диссертационных советов, которые систематически направляют в библиотеки не все авторефераты диссертаций по утвержденному списку рассылки.

Положение о совете по защите докторских и кандидатских диссертаций (приказ Минобрнауки от 09.01.2007 № 2), обязывало соискателей ученой степени доктора наук представлять текст автореферата диссертации на сайте ВАК, а кандидата наук — на официальном сайте учреждения, при котором создан диссертационный совет. На официальных сайтах учреждений, за немногим исключением, с 2007 года созданы электронные ресурсы авторефератов диссертаций. В табл. 1 перечислены диссертационные советы, принимающие к рассмотрению диссертации по специальности 14.03.10 «клиническая лабораторная диагностика». До 2014 года медицинские диссертации мог принимать к рассмотрению диссертационный совет при Саратовском государственном медицинском университете имени В.И. Разумовского. Объявления и архивы авторефератов диссертаций представлены на сайтах учреждений в разделах «Наука» — «Диссертационные советы» — «Объявления о защите диссертаций» — «Архивы авторефератов диссертаций». Электронные ресурсы не содержат работы, представленные с грифом «для служебного пользования».

В последние годы в РНБ отсканированы 331 автореферат диссертации по специальности 14.03.10 (14.00.46) «клиническая лабораторная диагностика» за 2000–2012 годы, которые составили 81,5% от общего количества сформированного нами массива диссертаций. В РГБ оцифровываются авторефераты и диссертации. В общей сложности отсканированы

Таблица 1
Список диссертационных советов, принимающих к рассмотрению диссертации по специальности 14.03.10 «клиническая лабораторная диагностика» (на 06.06.2014) [6]

Шифр совета	Отрасль науки	Название учреждения, город
Д 205.001.01	Медицинские, биологические	Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России (С.-Петербург)
Д 215.002.08	Медицинские	Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова (С.-Петербург)
Д 208.071.04	Медицинские	Российская медицинская академия последипломного образования (Москва)
Д 208.072.08	Биологические	Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова (Москва)

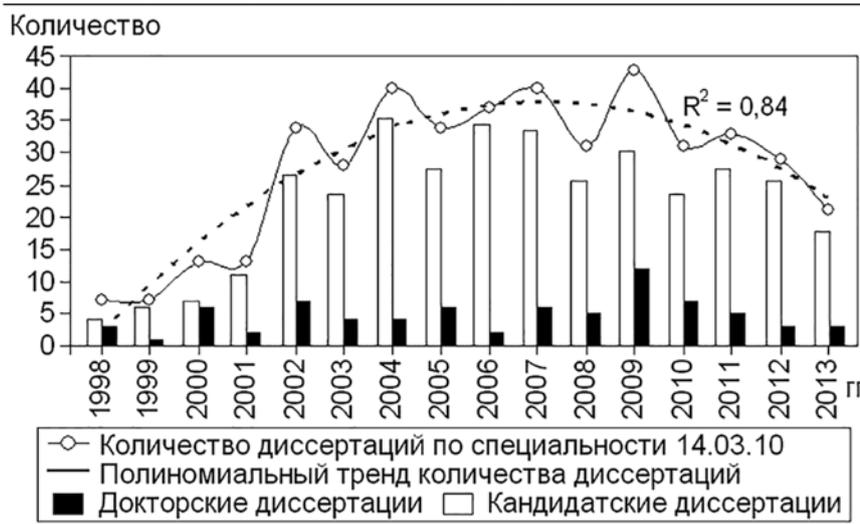


Рисунок 1. Динамика количества диссертаций по специальности 14.03.10 «клиническая лабораторная диагностика».



Рисунок 2. Структура диссертаций по специальности 14.03.10 «клиническая лабораторная диагностика» по отраслям знаний и ученым степеням.



Рисунок 3. Динамика вклада диссертаций по специальности 14.03.10 «клиническая лабораторная диагностика» в общий поток суммы медицинских и биологических диссертаций в России (в процентах).



Рисунок 4. Структура обобщенных отраслей знаний в диссертациях, выполненных на стыке наук.

58,6% диссертаций и 70,8% авторефератов диссертаций за 2000–2012 годы. Полагаем, что как минимум 35–40% оцифрованных авторефератов в РНБ и РГБ дублируются. Согласованности или разделения сфер оцифровки документов между сотрудниками РГБ и РНБ нет, каждая библиотека проводит сканирование документов самостоятельно, что приводит к избыточному расходованию ресурсов и снижает оперативность представления информации потребителю.

С 09.04.2012 полные тексты кандидатских и докторских диссертаций размещаются на официальном сайте ВАК Минобрнауки РФ в опции «Объявления о защите докторских диссертаций», хотя здесь представлены и авторефераты кандидатских диссертаций. Анализ авторефератов по специальности 14.03.10 «Клиническая лабораторная диагностика», показал, что в 2013 году в диссертационных советах России были рассмотрены 23 диссертации. Докторских работ было три, биологических диссертаций одна. Чтобы составить такой краткий анализ и изучить содержание диссертационных исследований раньше могло потребоваться не менее года. Например, до настоящего времени в электронных каталогах РНБ не значатся диссертационные работы за 2013 год, а следовательно, с их содержанием нельзя ознакомиться.

Результаты и их анализ

Сравнение данных электронных каталогов РГБ, РНБ, «Российская медицина» ЦНМБ и ВАК Минобрнауки России позволили сформировать массив из 444 диссертаций по специальности 14.03.10 «клиническая лабораторная диагностика», представленных в диссертационные советы России в 1996–2013 годах. В 1996–1997 годах происходил процесс становления научной специальности, были выполнены только одна и две диссертации соответственно. Реально поток диссертационных исследований был сформирован с 1998 года (рис. 1), что нашло отражение в наших исследованиях.

Изучены 441 диссертация за 1998–2013 годы. Полиномиальный тренд динамики количества диссертаций по клинической лабораторной диагностике при коэффициенте детерминации $R^2 = 0,84$ напоминает

Таблица 2

Структура научных направлений паспорта диссертаций по специальности 14.03.10 «клиническая лабораторная диагностика» (1998–2013 годы)

Направление исследования	Содержание	Процент
1-е	Основы теории клинической лабораторной диагностики	30,0
2-е	Химические исследования биологических жидкостей	21,1
3-е	Морфологические (цитологические) исследования биоматериала	6,6
4-е	Иммунологические исследования	16,7
5-е	Микробиологические исследования	8,5
6-е	Цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследований	4,1
7-е	Методы лабораторной диагностики	10,3
8-е	Основы организационного обеспечения клинической лабораторной диагностики	2,7

пологую инвертируемую U-кривую с максимальными показателями в 2004–2009 годах. Ежегодно в диссертационные советы представлялись по 28 ± 3 диссертации, в том числе докторских 5 ± 1 , кандидатских 23 ± 3 .

Медицинских диссертаций было 85,7%, биологических 14,3%. Докторские диссертации составили 17,2%, кандидатские 82,8%. При невысоких коэффициентах детерминации в 1998–2013 годах происходит увеличение количества медицинских диссертаций при стабилизации соотношений кандидатских и докторских. В общем массиве всех диссертаций в России отмечается тенденция к уменьшению количества работ, представленных на соискание ученой степени доктора наук. Обобщенная структура работ по отраслям знаний и ученым степеням представлена на рис. 2.

Уместно заметить, что в общем потоке суммы всех медицинских и биологических диссертаций в России докторские диссертации за аналогичный период составили 15,4% ($p > 0,05$), а массив диссертаций по клинической лабораторной диагностике около 0,5%. При коэффициенте детерминации $R^2 = 0,79$ отмечается увеличение вклада количества диссертаций по специальности 14.03.10 «клиническая лабораторная диагностика» в общий поток медицинских и биологических диссертаций в России (рис. 3).

На стыке наук или по двум специальностям были выполнены 58,3% диссертационных исследований. В структуре специальностей, выполненных на стыке наук (рис. 4), преобладают специальности по клинической медицине (68,5%) и медико-биологическим наукам (20,2%).

Наиболее часто вторыми специальностями были: 14.03.09 «клиническая иммунология, аллергология» (24 работы); 14.01.10 «кожные и венерические болезни» (19 работ); 14.01.01 «акушерство и гинекология» (17 работ); 14.01.11 «нервные болезни» и 14.01.21 «гематология и переливание крови» (по 15 работ); 14.01.05 «кардиология» и 14.03.03 «патологическая физиология» (по 13 работ); 14.01.24 «трансплантология и искусственные органы» (11 работ). Обращает на себя внимание увеличение количества работ по клинической лабораторной диагностике

при трансплантации органов и тканей, однако в паспорте специальности это направление не представлено.

Анализ содержания диссертаций позволил распределить массив работ по направлениям научных исследований паспорта специальности (табл. 2). Следует указать, что содержание около 20% диссертаций соотносилось с двумя или тремя направлениями исследований. Небольшое количество диссертаций по третьему, пятому и шестому направлениям исследований объясняется возможностью представления работ в диссертационные советы по другим отраслям науки (генетика, микробиология, вирусология, гистология, онкология, патологическая анатомия). Малое количество диссертаций по восьмому направлению (см. табл. 2), возможно, обусловлено сложностью введения инноваций отдельными диссертантами в сформированную систему организации лабораторной диагностики, которая во многом определяется зарубежными фирмами-монополистами.

В постановлении правительства «О федеральной информационной системе государственной научной аттестации» от 18.10.2013 № 1005 [7] указывается на необходимость создания единой информационной диссертационной системы и ничего не сказано, как поступать с архивами авторефератов и диссертаций на бумажных носителях. Основные положения о создании единой информационной диссертационной системы включены в современные нормативные документы по подготовке научных кадров [8, 9]. Диссертационным советам рекомендовано размещать полные тексты авторефератов и диссертаций соискателей ученых степеней в сети интернет.

В настоящее время сотрудниками Научной электронной библиотеки (НЭБ) создан Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), который в настоящее время включает около 4,7 млн публикаций российских авторов (в основном с 2005 года), более 20 млн ссылок из списков пристатейной литературы и т. д. База данных РИНЦ позволила сформировать информационно-аналитическую систему Science Index для авторов и организаций. Полагаем, что при государственной поддержке НЭБ может стать единой полнотекстовой электронной базой данных диссертационных исследований в России.

Заключение

Сравнение электронных ресурсов ведущих библиотек России, официальных сайтов учреждений, при которых созданы диссертационные советы, и ВАК Минобрнауки России позволили сформировать массив из 444 диссертаций по специальности 14.03.10 (14.00.46) «клиническая лабораторная диагностика» в 1996–2013 годах. Они составили около 0,5% от суммы всех биологических и медицинских диссертаций в России.

Ежегодно в диссертационные советы представлялись по 28 ± 3 диссертации. Медицинских работ было 85,7%, биологических 14,3%. Докторские диссертации составили 17,2%, кандидатские 82,8%. Отмечается увеличение количества вклада медицинских диссертаций и стабилизация соотношений докторских и кандидатских диссертаций. На стыке наук (по двум специальностям) были выполнены 58,3% диссертаций.

Анализ структуры направлений научных исследований паспорта

специальности показал, что основы теории клинической лабораторной диагностики (первое направление) проводились в 30 % диссертаций, химические исследования биологических жидкостей (второе) в 11,1 %, морфологические (цитологические) исследования биоматериала (третье) в 6,6 %, иммунологические исследования (четвертое) в 16,7 %, микробиологические исследования (пятое) в 8,5 %, цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследований (шестое) в 4,1 %, методы лабораторной диагностики (седьмое) в 10,3 %, основы организационного обеспечения клинической лабораторной диагностики (восьмое) в 2,7 %.

В последние годы некоторые библиотеки проводят оцифровку авторефератов и диссертаций на бумажных носителях. Исследования показали, что по крайней мере 35–40 % авторефератов диссертаций при сканировании дублируются сотрудниками Российской государственной библиотеки и Российской национальной библиотеки. Библиотечному сообществу следует распределить сферы

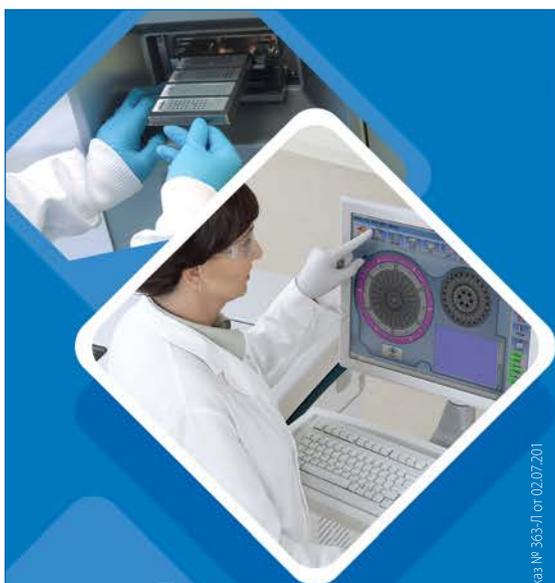
оцифровки документов на бумажных носителях, что сохранит ресурсы, снизит стоимость продукции и повысит оперативность работы.

Необходима бесплатная национальная подписка (для всех библиотек страны) к базам данных оцифрованных материалов диссертационных исследований. Полагаем также, что при государственной поддержке Научная электронная библиотека может стать единой полнотекстовой электронной базой данных диссертационных исследований в России.

Представление материалов диссертационных исследований в сети интернет дает возможность их изучать и за рубежом. Для интеграции в мировое научное сообщество соискателям ученых степеней следует рекомендовать на последней странице автореферата представлять резюме диссертационного исследования (не менее 250–300 знаков) на английском языке и направлять электронную версию диссертаций в международную базу данных диссертационных работ ProQuest Dissertations & Theses.

Список литературы

1. Кононова С. В. Развитие государственной системы подготовки научных кадров высшей квалификации в России (1724–2005): монография. Ставрополь: Ставропольский госуниверситет, 2006. 410 с.
2. Якушев А. Н., Климов А. Ю. Оценка результатов диссертаций на соискание ученых степеней в России. // Гос. служба. 2008. № 2. С. 115–121.
3. Номенклатура специальностей научных работников: прил. к приказу Минобрнауки РФ от 25.02.2009 № 59. // Бюл. Минобрнауки РФ. 2006. № 7. С. 25–55.
4. Паспорта специальностей научных работников [ред. от 18.01.2011 г.]. // ВАК Минобрнауки РФ. URL: <http://www.mon.gov.ru/work/nii/dok/vak/11.01.18-pasporta>.
5. Российская Федерация. Законы. ... Об обязательном экземпляре документов: федер. закон. [и др.]. М.: Ось-89, 2008. 47 с.
6. Список действующих диссертационных советов. // ВАК Минобрнауки РФ. URL: <http://www.vak.ed.gov.ru/dissovet/>.
7. О федеральной информационной системе государственной научной аттестации: постановление правительства от 18.10.2013 № 1005. // Собр. законодательства Рос. Федерации. 02.12.2013. № 48. Ст. 6251.
8. Положение о порядке присуждения ученых степеней: утв. постановлением правительства РФ от 24.09.2013 № 842. // Собр. законодательства Рос. Федерации. 07.10.2013. № 40. Ст. 5074.
9. Положение о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук на соискание ученой степени доктора наук: утв. приказом Минобрнауки РФ от 13.01.2014 № 7. // Рос. газета. 05.03.2014. № 51.



МОБИЛ МЕДИКАЛ ЛАБ

127055, Россия, г. Москва,
ул. Новослободская, д. 36/1, стр. 3
тел.: +7 (495) 781-000-3,
e-mail: lab.info@mobil-med.org
сайт: www.mobil-med.org

Лицензия № 10-77-01-010487 от 02.07.2015, Приказ № 363-П от 02.07.2015

МОБИЛ МЕДИКАЛ ЛАБ

«Мобил Медикал Лаб» — недавно созданная высокотехнологичная многопрофильная лаборатория, соединившая уникальную десятилетнюю практику обследования больших групп населения и опыт развития крупной современной лаборатории

Оптимизация работы всех подразделений лаборатории:

- ◆ Автоматизация всех этапов лабораторного процесса, в том числе и таких «привычных», но трудноавтоматизируемых исследований, как серологические исследования, общий анализ мочи и микробиологические исследования,
- ◆ Современная лабораторно-информационная система,
- ◆ Оборудование, реагенты и расходные материалы ведущих мировых производителей,
- ◆ Участие в системах внешнего контроля качества всероссийской (ФСВОК) и международной (EQAS),
- ◆ Квалификация персонала и рациональное использование человеческих ресурсов

позволяет выполнять исследования быстро и качественно, сохранить демократичным ценам.

Сравнение двух стратегий управления лабораторными назначениями

Т. М. Ивашикина, д.м.н., гл. врач¹

О. А. Клименкова, врач клинической лабораторной диагностики¹

В. П. Пашкова, зам. гл. врача по лабораторной службе¹

О. Г. Бондаренко, к.м.н., зав. клинико-диагностической лабораторией²

В. С. Берестовская, к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины³

¹СПбГУЗ «Консультативно-диагностический центр для детей» (СПб КДЦД), г. Санкт-Петербург

²ГБУЗ «Областная клиническая больница № 3» (ЧОКБ), г. Челябинск.

³ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» (ПСПбГМУ), г. Санкт-Петербург

Comparison of two laboratory utilization management strategies

T. M. Ivashkina, O. A. Klimenkova, V. P. Pashkova, O. G. Bondarenko, V. S. Berestovskaya

Consultative-Diagnostic Center for Children, Saint Petersburg; Regional Clinical Hospital № 3, Chelyabinsk; the First Saint Petersburg State Medical University n. a. academician I. P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Поскольку от современных лабораторий требуют делать больше медицинских анализов при меньших ресурсах, необходимо решить проблему чрезмерного и неполного использования лабораторных анализов. Управление назначениями в лабораторной медицине основано на инициативах, обеспечивающих снижение числа тестов при повышении их клинической значимости. Обсуждаются две стратегии для регулирования числа заказываемых тестов: административное ограничение и свободный выбор клиницистов в условиях системы взаимозачетов между лабораторией и клиническими отделениями. Показано, что обе инициативы приводят к снижению количества лабораторных тестов, но только вторая отвечает требованию клинической значимости.

Ключевые слова: управление назначениями, клиническая лаборатория, меры по рационализации назначений.

Summary

As laboratories are challenged to do more with fewer resources, the problem of overuse and underuse of laboratory testing must be solved. Utilization management in laboratory medicine is based on the initiatives that ensure using less tests together with rising clinical effectiveness. Two strategies for test order regulations are being discussed: an administrative limitation, and a free choice of clinicians under a mutual offsets system between the laboratory and clinical departments. It was shown that both initiatives lead to using less test but only the second one adheres to the clinical effectiveness requirement.

Key words: utilization management, clinical laboratory, utilization interventions.

Бюджеты здравоохранения во всем мире сталкиваются с возрастающим давлением, направленным на сокращение финансовых вложений в сочетании с повышением эффективности систем оказания медицинской помощи. Сокращение коечного фонда, количества и квалификации врачей в первичном звене связывают со снижением доступности и качества медицинской помощи. С общественных позиций такие шаги являются социально непопулярными [2], и при этом, как допустимый, рассматривается сценарий, при котором лабораториям предлагается сократить объемы анализов и уровень качества выполняемых исследований за счет отказа от наиболее современных технологий.

На лабораторную диагностику приходится около двух процентов расходов систем здравоохранения, но именно эта сфера выходит на первый план при секвестре медицинских бюджетов. По существу, финансовые реформы многих правительств в Европе нацелены на контроль,

и даже ограничение расходов на диагностику *in vitro*. В частности, в Венгрии бюджет для компенсации лабораторных услуг заморожен с 2002 года, Национальный медицинский формуляр Италии установил 35-процентное сокращение цен на лабораторную диагностику при сокращении расходов государственной службы здравоохранения на 10% [6]. По мнению министра здравоохранения В. И. Скворцовой, расходы на закупку реактивов для лабораторных исследований в Российской Федерации могут быть снижены на 25% [3].

Самым простым способом регулирования расходов на лабораторную медицину считается снижение числа назначений в заказе на исследование [9]. При этом особое внимание уделяется тестам с большей стоимостью, которые рассматриваются как резерв для уменьшения затрат. Опасность подобного формального подхода к регулированию расходов на лабораторию в том, что ограничительные меры направлены на совре-



Т. М. Ивашикина



О. А. Клименкова



В. П. Пашкова



О. Г. Бондаренко



В. С. Берестовская

менные тесты, диагностическая ценность которых выше, чем рутинных. Альтернативный путь регулирования объема лабораторных исследований основан на системе управления назначениями (utilization management), междисциплинарном подходе, реализуемом в рамках всей организации и направленным на баланс качества, рисков и расходов в процессе предоставления медицинской помощи [8]. Стратегии управления назначениями могут быть представлены в форме отмены повторных исследований, консультативной помощи со стороны лаборатории при формировании заказа и принятии клинических решений, оценки и сравнении назначений врачей из разных медицинских организаций, удаления устаревших тестов и введения алгоритмов назначения лабораторных исследований [10]. Данная система рассматривается профессиональным сообществом как наиболее адекватный способ сокращения чрезмерных и нецелесообразных исследований без ущерба качеству оказания медицинской помощи.

Целью исследования явилось сравнение двух стратегий регулирования лабораторных назначений, одна из которых основана на использовании мер административного ограничения лабораторных заказов, вторая на свободном выборе лечащих врачей при реализации системы взаимозачетов между лабораторией и клиническими отделениями.

Материал и методы

Анализировались лабораторные исследования, которые были заказаны терапевтами городской взрослой поликлиники N (ГВП N), являющейся заказчиком лабораторных услуг в межрайонной клинко-диагностической лаборатории Санкт-Петербургского консультативно-диагностического центра для детей в марте и октябре 2014 года. Также изучалась динамика назначений на лабораторные исследования в Областной клинической больнице № 3 г. Челябинска (ЧОКБ № 3) в период с 2012 по 2014 годы.

Данные по заказанным тестам были выгружены из лабораторных информационных систем, функционирующих в клинко-диагностических лабораториях. Статистическую

обработку данных по назначениям проводили в программе Microsoft Office Excel, 2010.

Результаты и обсуждение

Стратегия 1. Для понимания того, каким образом отражается административное ограничение на количестве и структуре лабораторных тестов, мы сравнили заказы, полученные от 33-х участков терапевтов, работающих на сопоставимых участках в ГВП N; в марте и октябре 2014 года в выборку были включены одни и те же специалисты. Группой сравнения послужили назначения, выполненные в марте 2014 года, когда при выборе перечня тестов и объема исследований лечащие врачи руководствовались собственными предпочтениями. Во второй половине года администрация предложила снизить объем расходов на лабораторные услуги, и, таким образом, тесты, заказанные в октябре, находились под воздействием ограничительных мер. Данные по назначениям до (март 2014 года) и после (октябрь 2014 года) введения административных мер сдерживания назначений, представлены в табл. 1.

Поскольку строгое следование стандартам медицинской помощи не является обязательным, а врач должен руководствоваться потребностью конкретного пациента [4], для поиска эффективных решений, направленных на оптимизацию лабораторных расходов, необходимо понять, на что опираются клиницисты при назначении исследований. Результаты, приведенные в табл. 1, иллюстрируют значительный разброс в количестве назначений врачами одной и той же специальности, что указывает на разнородное понимание клинической ценности тестов при назначении их пациентам из однородных групп. В литературе описывается 17-кратная вариативность лабораторных назначений врачами, работающими с одним и тем же диагнозом [14]. Для ГВП N установлен 82-кратный разброс между минимальным и максимальным числом назначений на одного терапевта в марте и 224-кратный в октябре 2014 года. Столь значительная разница в потребности лабораторных исследований для терапевтов ГВП N, работающих на сопоставимых участках, позволяет сделать вы-

вод, что решающими при выборе лабораторных тестов являются личные предпочтения каждого врача, а не медицинская целесообразность.

Тем не менее ограничительные меры административного характера в ГВП N привели к снижению числа лабораторных назначений на 38,5%. К сожалению, уменьшение количества назначений не было обусловлено отказом от чрезмерных и нецелесообразных тестов. Врачи, назначающие заведомо избыточные тесты, практически не отреагировали на необходимость ограничения заказов. Наоборот, наибольший процент снижения отмечен для минимального и 10-го перцентиля числа назначений на одного терапевта, в то время как 90-й перцентиль уменьшился только на 5,2%, а снижение максимального значения количества назначений меньше среднего по группам (табл. 1).

Следующий аспект, требующий обсуждения: за счет каких исследований были достигнуты изменения. Для этого мы сравнили структуру назначений в марте и октябре 2014 года (табл. 2). Лабораторные исследования были классифицированы по группам согласно тарифам на лабораторные исследования Территориального фонда ОМС г. Санкт-Петербурга (приложение № 13 к Генеральному тарифному соглашению на 2014 год). Обратившись к структуре назначений, можно увидеть, что в октябре она не претерпела существенных изменений по сравнению с мартом, отмечается пропорциональное снижение количества всех видов исследований. Административное давление, сконцентрированное на снижении количества лабораторных исследований, достигло цели через врачей, опасаящихся недовольства со стороны руководства, и не привело к смещению акцента в сторону тестов с высокой диагностической значимостью.

Существует мнение, что от 25 до 40% анализов являются нецелесообразными [11]. Более того, между большим числом анализов и лучшим исходом заболеваний корреляция отсутствует, а между количеством анализов и исходом лечения отмечена обратная пропорциональная связь, то есть менее компетентные врачи заказывают больше анализов. Как правило, молодые сотрудники боятся

Таблица 1

Характеристика лабораторных назначений, проведенных 33 участковыми терапевтами городской взрослой поликлиники N до (март 2014 года) и после (октябрь 2014 года) введения административных мер по ограничению лабораторных назначений

	Характеристика лабораторных назначений за март 2014 года	Характеристика лабораторных назначений за октябрь 2014 года	Дельта между показателями октября и марта	Процент изменения между показателями марта и октября 2014 года
Всего тестов	24611	15132	9479	38,5
Среднее число назначений на одного терапевта	609	530	79	12,9
Медиана числа назначений на одного терапевта	535	456	79	14,7
Минимальное число назначений на одного терапевта	33	9	24	72,7
Максимальное число назначений на одного терапевта	2729	2020	709	25,9
10 P* числа назначений на одного терапевта	117	39	78	66,6
90 P* числа назначений на одного терапевта	1095	1038	57	5,2

Примечание: *P — перцентиль.

выговоров больше, чем дискомфорта пациентов, ненужной флеботомии и излишних трат [7]. Установление факторов, определяющих причины выбора тех или иных лабораторных тестов, является важным этапом при разработке стратегии управления назначениями.

Стратегия 2. Челябинская ОКБ № 3 включает в себя стационар на 1066 коек, родильный дом на 163 койки, женскую консультацию, поликлинику с двумя филиалами и дневным стационаром. Поскольку современные медицинские организации работают в условиях ограниченных ресурсов, руководители вынуждены уделять значительное внимание повышению эффективности лабораторий. С 2012 года в ЧОКБ № 3 была введена система взаимозачетов между клиническими отделениями и клинико-диагностической лабораторией. Сегодня для каждого лечебного подразделения ведется учет количества исследований в объ-

еме затрат на реагенты и условных единицах трудоемкости сотрудников лаборатории. Далее из фонда медикаментов клинического подразделения высчитываются затраты на реактивы, а из фонда заработной платы — возмещение труда сотрудников диагностических подразделений. Движущая сила такой политики заключается в возможности выбора тестов лечащим врачом с одновременной финансовой ответственностью внутри медицинской организации.

Динамика количества и структуры лабораторных назначений в ЧОКБ № 3 за 2012–2014 годы представлены в табл. 3. Ее данные наглядно свидетельствуют, что предложенная модель приводит к снижению числа назначений со значительным изменением структуры назначаемых тестов. За анализируемый период на 39% возросло число иммунологических, на 314% цитологических, на 49% иммунологических и на 46% микробиологических исследований. Обратные

изменения коснулись гематологических и общеклинических назначений, потребность в которых снизилась на 16 и 20% соответственно.

Анализируя вклад каждого из видов исследований, можно наблюдать, как от года к году происходили осознание клинической значимости тестов и постепенный переход в лабораторных назначениях от практики по «объему» к практике по «ценности» [13]. Показательно, что в структуре иммунологических тестов наблюдается серьезное возрастание вклада так называемых дорогостоящих тестов (табл. 4), поскольку именно они позволяют получить объективную информацию для принятия клинического решения.

По мере углубления мирового финансового кризиса появляются убедительные доказательства того, что во многих случаях лабораторные анализы являются самым экономичным способом получения клинической информации. Например, отечественные

Таблица 2

Сравнение лабораторных назначений городской взрослой поликлиники N до (март 2014 года) и после (октябрь 2014 года) введения административных мер по ограничению лабораторных назначений

Группы исследований	Количество лабораторных назначений за март 2014 года	Количество лабораторных назначений за октябрь 2014 года	Доля лабораторных назначений за март 2014 года, %	Доля лабораторных назначений за октябрь 2014 года, %
Биохимические исследования	15198	8770	61,8	58,0
Иммунохимические исследования	3028	2111	12,3	14,0
Гормоны	1637	1165	6,7	7,7
Общеклинические исследования	4748	3086	19,2	20,3
Всего	24611	15132	100	100

Таблица 3
Количество и структура лабораторных назначений в Челябинской областной клинической больнице № 3 за период 2012–2014 годов

Виды исследований / годы	2012	2013	2014
Гематологические, число	1 183 814	1 203 381	983 586
Процент от всех исследований	37,5	38,1	32,7
Изоиммунологические, число	80 916	84 997	112 693
Процент от всех исследований	2,55	2,69	3,7
Цитологические	7 081	27 176	29 378
Процент от всех исследований	0,23	0,86	0,97
Биохимические	1 009 356	984 755	1 112 902
Процент от всех исследований	32,1	31,2	36,9
Коагулологические	102 122	107 946	125 612
Процент от всех исследований	3,25	3,42	4,17
Иммунологические	12 831	12 970	19 229
Процент от всех исследований	0,41	0,41	0,64
Микробиологические	36 484	35 327	53 579
Процент от всех исследований	1,16	1,12	1,78
Общеклинические	718 952	698 272	574 771
Процент от всех исследований	22,8	22,2	19,1
Всего исследований	3 151 556	3 154 824	3 011 750

Таблица 4
Процент изменения числа лабораторных тестов относительно назначений за 2012 год (приняты за 100%), заказанных в Челябинской областной клинической больнице № 3 в период 2012–2014 годов

Лабораторный тест / год	2012	2013	2014
Тропонин Т	100	160	259
Прокальцитонин	100	202	247
Д-димер	100	137	265
Гликированный гемоглобин	100	160	274

данные показывают, что тактика двухэтапного измерения содержания прокальцитонина для принятия решения о продолжительности антибиотикотерапии обеспечивала экономию денежных средств на 24,8% по сравнению с группой, где терапия проводилась без учета результатов исследования на прокальцитонин [1]. В европейских странах, в частности, в Германии, при полной стагнации рынка лабораторных услуг наблюдается почти 8-процентный рост исследований, связанных с законом по профилактике внутрибольничных инфекций. В Великобритании и Испании при снижении расходов на диагностику *in vitro* растет сегмент тестов, направленных на контроль над применением антибиотиков и предупреждение антибиотикорезистентности [6].

Динамика назначений в приведенных примерах показывает, что обе стратегии достигают цели снижения числа лабораторных исследований, но требованию клинической значимости в полной мере отвечает система управления назначениями, реализо-

ванная в ЧОКБ № 3. Инструменты исключительно финансового давления могут неблагоприятно влиять на предоставление медицинских услуг в целом, так как снижают качество диагностики и безопасность пациентов [12].

По мнению Джеффри Бэрда, призыв к «увеличению бдительности», как способу регуляции назначений, имеет слабый и непродолжительный эффект, так как не опирается на заинтересованность клиницистов. Альтернативный подход на основе системы управления назначениями наиболее сложен для реализации, так как в него вовлекаются многие участники (клиницисты, лаборатория, администрация, информационные ресурсы и т.д.) Но из всех вариантов с сильным воздействием комбинированный подход является наиболее эффективным и долгосрочным [5].

Заключение

Большинство из нас четко осознают необходимость реформирования системы предоставления лаборатор-

ных услуг. В нашей стране инициативы, направленные на снижение лабораторных расходов, оптимизацию назначений и снижение числа ненужных тестов, делают первые шаги. В связи с этим очень важно на этапе разработки стратегии управления назначениями заложить в ее основу клиническую эффективность, а не ориентироваться только на финансовые и нередко спорные расчеты.

Список литературы

- Носков И.Ю., Руднов В.А. Динамика содержания прокальцитонина в крови может быть основанием для прекращения антибиотикотерапии при пневмококковом сепсисе. // Интенсивная терапия. — 2009. — № 2 (16). — С. 73.
- Программа «Де-факто» от 09.04.2015. OPT. URL: <http://www.otr-online.ru/programmi/guzel-ulumbekova-o-38211.html>. Дата обращения 15.08.2015.
- Скворцова В.И. Интервью. URL: <http://www.zdrav.ru/news/96169/>. Дата обращения 31.08.2015.
- Стародубов В.И., Кадыров Ф.Н. Вопросы использования стандартов медицинской помощи в системе. // Менеджер здравоохранения. — 2015. — № 5. — С. 60–74.
- Baird G. The laboratory test utilization management toolbox. // *Biochemia Medica*. — 2014. — Vol. 24, № 2. — p. 223–234.
- European IVD Market Statistics Reports. Report 2013. URL: <http://www.edma-ivd.eu/index.php?mact=EuropeanIVDMarketStatistics, me8bc7, view, 1&me8bc7details=106&me8bc7returnid=104&page=104>. Дата обращения 30.08.2015.
- Garland A., Shaman Z., et al. Physician-attributable differences in intensive care unit costs: a single-center study. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2006. — Vol. 174. — P. 1206–1210.
- Kongstvedt P. *Essentials of managed health care*. Gaithersburg, MD: Aspen; 1997.
- Lippi G., Mattiuzzi C. Testing volume is not synonymous of cost, value and efficacy in laboratory diagnostics. // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 2013. — Vol. 51, № 2. — P. 243–245.
- Melanson S.E.F. Establishing benchmarks and metrics for utilization management. // *Clinica Chimica Acta*. — 2014. — Vol. 427. — P. 127–130.
- Rao GG, Crook M, Tillyer ML. Pathology tests: is the time for demand management ripe at last? // *J. Clin. Pathol.* — 2003. — Vol. 56. — P. 243–248.
- Smellie W.S.A. Demand management and test request rationalization. // *Annals of Clinical Biochemistry*. — 2012. — Vol. 49. — P. 323–336.
- Snozcek Ch., Kaleta E., Hernandez J.S. Management structure: Establishing a laboratory utilization program and tools for utilization management. // *Clinica Chimica Acta*. — 2014. — Vol. 427. — P. 118–122.
- Yeh D.D.A clinician's perspective on laboratory utilization management. // *Chimica Acta*. — 2014. — Vol. 427. — P. 145–150.





На правах рекламы

Модульные платформы cobas®

Концепция гибких и индивидуальных решений

Сегодня перед лабораториями стоит задача надежной и высококачественной аналитики и в то же время – обеспечения эффективного рабочего процесса. Для удовлетворения этих потребностей компания Рош разработала концепцию сывороточной рабочей зоны на основе модульной платформы cobas.

Сопоставимые результаты на всех системах благодаря единой реагентной концепции

Консолидация более чем 90% рутинных параметров

Согласованность результатов

Высокая эффективность

Благодаря модульной концепции системы легко наращиваются

Единая концепция реагентов значительно облегчает их логистику

Уверенность в будущем

Легкость

ООО «Рош Диагностика Рус»:
115114, Россия, г. Москва,
ул. Летниковская, д. 2, стр. 2,
Бизнес-центр «Вивальди-Плаза»
Тел.: +7 495 229-69-99
Факс: +7 495 229-79-99
www.rochediagnostics.ru



COBAS, COBAS B и LIFE NEEDS ANSWERS являются торговыми марками Roche.
© 2015, Рош

cobas®

Life needs answers



Неканонические способы активации тромбоцитов человека

М. С. Макаров, к.б.н., научный сотрудник

ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского» (НИИ СП) департамента здравоохранения г. Москвы

Non-canonic ways to human platelet activation

M.S. Makarov

The Scientific and Research Institute of Emergency Care n.a. N.V. Sklifosovsky, Moscow, Russia

Резюме

В статье рассматривается возможность запуска основных функций тромбоцитов без стандартных индукторов активации. Приводятся примеры действия химических, физических и биологических факторов, *in vitro* и *in vivo* стимулирующие процессы активации тромбоцитов, их агрегации и дегрануляции.

Ключевые слова: **тромбоциты, гранулы, дегрануляция, агрегация.**

Summary

The possibility of human platelet activation without standard agonists is discussed with the analysis of chemical, physical and biological methods, following to platelet activation, aggregation and granule release.

Key word: **platelets, granules, degranulation, aggregation.**

Тромбоциты человека представляют собой уникальные клетки, которые при всей их высокой дифференцированности играют значительную роль во многих биологических процессах. Помимо участия в системе гемостаза, тромбоциты выполняют ангиотрофическую, эндотелий-поддерживающую, транспортную, репаративную, рост-стимулирующую функции [31]. Такая полифункциональность тромбоцитов во многом обусловлена наличием в них большого количества биологически активных веществ разнонаправленного действия. Эти вещества содержатся в секреторных везикулах (гранулах) тромбоцитов и высвобождаются в процессе их активации. *In vivo* и *in vitro* активация тромбоцитов обычно происходит под действием различных индукторов агрегации тромбоцитов (АДФ, коллаген, адреналин, тромбин, тромбоксан) или их синтетических аналогов, а также при контакте тромбоцитов с адгезивными поверхностями (коллаген, фибрин, искусственные полимеры, некоторые металлы) [31]. Эти способы активации тромбоцитов можно назвать каноническими. Однако помимо канонических, существуют еще и неканонические способы стимуляции адгезии или агрегации тромбоцитов, не связанные с действием стандартных

индукторов. Ниже мы предлагаем рассмотреть различные способы неканонической стимуляции функций тромбоцитов.

Образование тромбофибриновых сгустков под действием диметилсульфоксида

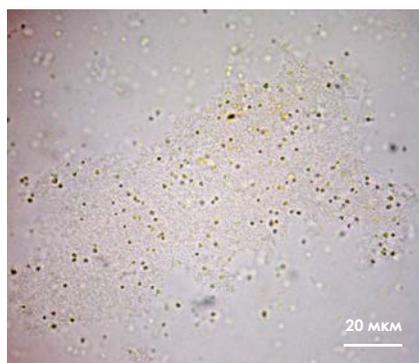
Диметилсульфоксид (ДМСО) — известный апротонный растворитель, который обладает высокой способностью проникать в биологические структуры. Благодаря этому свойству ДМСО используется в медицине в качестве агента, облегчающего доставку в поврежденные ткани противовоспалительных, бактерицидных, обезболивающих и противоопухолевых препаратов [5, 16]. Считается, что лекарственные дозы ДМСО (10–50%) нормализуют микроциркуляцию крови и фибринообразование [16, 30], однако данные о влиянии ДМСО непосредственно на клетки крови остаются противоречивыми. В некоторых работах указано, что использование ДМСО препятствовало развитию кровотечений у лабораторных животных [25], то есть, по всей видимости, ДМСО оказывает некое активирующее влияние на тромбоциты. Активность тромбоцитов под действием ДМСО в литературе не отражена; по нашим данным, в присутствии 5–6%

ДМСО в богатой тромбоцитами плазме (БТП) при комнатной температуре происходит постепенное снижение биологической полноценности тромбоцитов [3, 38], которое сопровождается в том числе разрушением гранул тромбоцитов без активации самих клеток. Однако если содержание ДМСО в среде с тромбоцитами составляет 20% и более, то, по нашим данным, наблюдается быстрое формирование фибриновых и тромбофибриновых сгустков даже при комнатной температуре. Наиболее выражен этот эффект при 30–40% ДМСО, когда время дегрануляции всех биологически полноценных тромбоцитов крови и БТП не превышает 10 минут, а размер образующихся тромбофибриновых сгустков может достигать 500 мкм (рис. 1). Наличие аналогичных доз в бесклеточной плазме не вызывает такого эффекта; под действием 30–40% ДМСО в плазме, лишенной клеток, формируются лишь мелкодисперсные фибриновые сгустки диаметром не более 25 мкм. Необходимо отметить, что фибринообразование в присутствии 30–40% ДМСО чаще всего не сопровождается изменением формы тромбоцитов, образованием отростков и формированием плотных агрегатов. Напротив, после воздействия 30–40% ДМСО тромбоциты имеют исход-

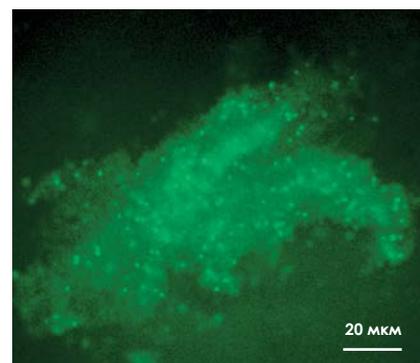
ную дисковидную форму, дисперсно распределены по объему фибринового сгустка и через некоторое время теряют с ним контакт, однако сам сгусток сохраняется. Предположительно, высокие дозы ДМСО резко повышают проницаемость мембран тромбоцитов, что вызывает быстрый выход содержимого гранул тромбоцитов по градиенту концентрации, стимулируя фибринообразование, и одновременно с этим препятствуя перестройке самих тромбоцитов. Таким образом, под действием ДМСО происходит не полноценная активация тромбоцитов, но реализация имеющегося в них биологического потенциала, в данном случае связанного с коагуляционной функцией. Этот потенциал может быть реализован даже в условиях полной инактивации тромбоцитов, например, под действием препаратов-антиагрегантов как в кровотоке, так и в составе биотрансплантатов [10]. Взаимодействие ДМСО с тромбоцитами позволит осуществить быстрое выделение материала из секреторных гранул с дальнейшим внедрением внутрь поврежденной ткани.

Агрегация тромбоцитов под действием перекиси водорода

Перекись водорода (H_2O_2) является наиболее стабильной из активных форм кислорода и потому может обладать наиболее выраженным и пролонгированным действием на клетки и их структуры. К настоящему моменту показана патогенетическая роль активных форм кислорода при более чем ста различных заболеваниях, связанных в первую очередь с нарушениями сердечно-сосудистой системы [12, 17]. В связи с этим вдвойне интересной представляется способность H_2O_2 стимулировать процессы активации тромбоцитов. Показано, что в присутствии 600–2 000 мкМ H_2O_2 в БоТП *in vitro* формируются многочисленные небольшие (20–30 мкм) агрегаты тромбоцитов, образованные тесно связанными и необратимо активированными клетками, благодаря чему агрегат не диссоциирует с течением времени [8, 13, 14]. Кроме того, 300 мкМ H_2O_2 резко



а



б

Рисунок 1. Тромбофибриновый сгусток, образовавшийся в богатой тромбоцитами плазме через 5 минут экспозиции с 40% ДМСО в проходящем свете (а) и при окрашивании трифлуорометилом-акридиновым оранжевым (б) при комнатной температуре (собственные данные).

усиливает агрегацию тромбоцитов, вызванную малыми дозами индукторов (0,5 мкМ АДФ, 0,5 мкМ серотонина, 1 мкМ тромбоксана), оказывая таким образом синергетическое стимулирующее действие [8]. Предварительное добавление в БоТП факторов, активно расщепляющих H_2O_2 , например, супероксиддисмутазы-хондроитинсульфат-каталазы, позволяет нейтрализовать активирующее действие перекиси на тромбоциты человека, а также снижает их адгезивную и агрегационную активность [2, 7]. Считается, что стимулирующее действие перекиси на тромбоциты связано с активацией систем внутриклеточного сигналинга (G-белки, циклооксигеназа, протеинкиназа C), а также с повышением внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} , что является важным фактором перестройки цитоскелета тромбоцитов с дальнейшей их активацией [8, 9, 34]. Есть мнение, что в низких дозах — до 50 мкМ — молекулы H_2O_2 выполняют сигнальную роль и даже способны ингибировать активацию тромбоцитов под действием АДФ [2, 13]; во всяком случае, регуляция внутриклеточного содержания H_2O_2 в тромбоцитах представляется особенно важной с точки зрения предотвращения их необоснованной активации. В покоящихся тромбоцитах нейтрализующие H_2O_2 органеллы (пероксисомы) тесно ассоциированы с плотной канальцевой системой, главным источником внутриклеточного кальция [22], с целью недопущения активации Ca^{2+} -каналов под действием эндогенной пере-

киси. В условиях оксидативного стресса, когда продукция активных форм кислорода резко повышается, возможна спонтанная активация тромбоцитов с формированием многочисленных микроагрегатов. Этот эффект может наблюдаться у пациентов с острым коронарным синдромом, сахарным диабетом, у беременных женщин при гестозе [20, 21, 23]. Напротив, наличие в среде активного ингибитора перекиси водорода приводит к тому, что биологически полноценные тромбоциты оказываются неспособными принимать вид сильно уплотненных, «блинообразных» клеток, то есть испытывают трудности с распластыванием на субстрате [2, 6–8]. Следовательно, наличие H_2O_2 в физиологических дозах необходимо для нормального функционирования тромбоцитов, а ее избыток способен стимулировать их активную агрегацию. Вместе с тем всегда необходимо помнить о повреждающем действии активных форм кислорода на многие биологические структуры, в первую очередь на клеточные мембраны, поэтому использование H_2O_2 для активации тромбоцитов в практических целях, например, при создании биотрансплантатов, имеет значительные ограничения.

Влияние тоничности среды на активность тромбоцитов

Изотония — баланс между осмотическим давлением внутри клетки и давлением внешней среды — является одним из необходимых условий поддержания нормального клеточного гомеостаза. В условиях

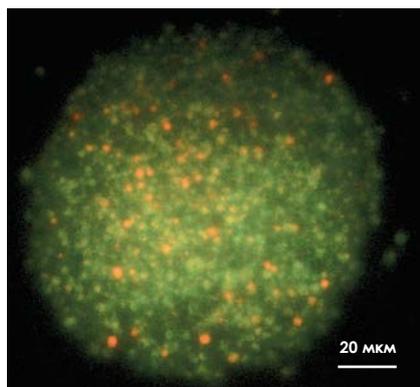
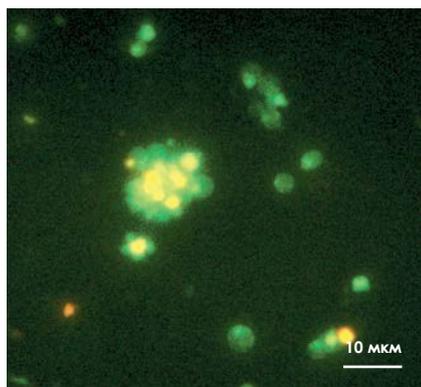


Рисунок 2. Тромбоциты человека в условиях гипотонии (0,11 М NaCl) при 22 °С. Окраска витальным красителем на основе трипафлавина и акридинового оранжевого (собственные данные): а) адгезия тромбоцитов на стекле с образованием агрегатов (Ag); б) крупный тромбоцитарный агрегат, образовавшийся в условиях 0,11 М NaCl.

гипо- или гипертонии происходит изменение осмотического баланса, что может быть причиной гибели клеток как *in vitro*, так и *in vivo* [33]. Вместе с тем при различных физиологических процессах внутри отдельных клеточных компартментов происходит целенаправленное изменение тоничности, необходимое для выполнения специфических функций. Так, этот эффект наблюдается в экзосомах активно секретирующих клеток, которые перед выбросом увеличиваются в объеме, набухают за счет увеличения внутреннего транспорта воды [26]. Набухание секреторных везикул является детерминированным процессом и осуществляется благодаря активности аквапоринов — трансмембранных белков, которые осуществляют активный транспорт молекул H_2O , K^+ и Cl^- [37]. Считается, что набухание секреторных везикул/гранул необходимо для их слияния с так называемыми поросомами — структурами на поверхности плазматической мембраны, которые осуществляют выброс содержимого гранул во внешнюю среду [27]. При этом набухание секреторных везикул фактически означает снижение тоничности их внутреннего раствора, то есть их экзоцитоз происходит в условиях внутренней гипотонии. Указанный эффект весьма подробно изучен на примере клеток эндокринной и экзокринной секреции; однако есть основание предположить, что он окажется справедливым и для других секретирующих клеток, в том числе для тромбоцитов.

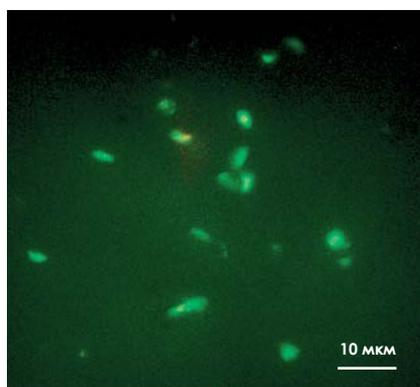


Рисунок 3. Тромбоциты человека в условиях гипертонии (0,6 М NaCl) при 22 °С. Окраска витальным красителем на основе трипафлавина и акридинового оранжевого (собственные материалы).

В частности, в работах А. Б. Самаль было установлено, что при помещении тромбоцитов человека в гипотоническую среду (0,06–0,1 М NaCl) и в отсутствие внеклеточных ионов Ca^{2+} происходит увеличение светопропускания тромбоцитной суспензии, при этом тромбоциты набухают и формируют псевдоподии [14]. По мнению авторов, изменение морфологии тромбоцитов связано с перестройкой их цитоскелета в условиях гипотонии. Проведенные нами исследования показали, что в диапазоне 0,075–0,11 М NaCl тромбоциты человека действительно претерпевают выраженные морфологические изменения и даже формируют многочисленные мелкие агрегаты, которые не разрушаются при ресуспендировании и возвращении в изотонические условия. Морфофункциональный анализ показал, что в условиях 0,075–0,11 М NaCl все биологически полноценные

тромбоциты (клетки с гранулами) имеют характерную округло-распластанную форму (рис. 2а), при этом гранулы в их составе заметно увеличены в диаметре и тесно связаны с плазматической мембраной в течение первых 5–10 минут воздействия. После этого часть гранул выходят за пределы тромбоцитов, что сопровождается их активацией как при 37 °С, так и при 22 °С. Формирование агрегатов наиболее выражено при 0,11 М NaCl: в этом случае порядка 90–95 % клеток с гранулами выявляются в составе агрегатов диаметром до 100 мкм (рис. 2 б). При 0,1 М NaCl максимальный размер агрегатов составлял 70 мкм, при 0,075 М NaCl — 40 мкм. В условиях гипотонии тромбоциты с гранулами активно адгезировали на стекле, (рис. 2 а), что позволяло отчетливо визуализировать их характерную распластанную форму с выраженным ламеллярным краем по всей окружности клетки. Перевод клеток обратно в изотоническую среду не сопровождался возвращением их дисковидной формы и исходного распределения гранул, что указывает на необратимость активации тромбоцитов в условиях гипотонии. Можно предположить, что набухание гранул тромбоцитов в условиях 0,075–0,11 М NaCl воспринимается системами внутриклеточного сигналинга как начало активной секреции гранул, что стимулирует характерную перестройку цитоскелета и дальнейшую активацию тромбоцитов.

В гипертонической среде (с концентрацией NaCl > 0,15 М) активации тромбоцитов не происходит, напротив, в условиях гипертонии тромбоциты полностью теряют способность к функционированию. Если в норме адгезивная активность тромбоцитов БотП значимо не меняется в течение суток при 22 °С, то при 0,25 М NaCl адгезивная активность полностью исчезала через 2,5 часа, при 0,35 М через 1,5 часа, при 0,6 М через 15 минут, при 1 М через 1–2 минуты. Под действием гипертонии тромбоциты сморщивались, принимали полигональную, веретеновидную или отросчатую форму, гранулы в их составе выявлялись

слабо, что может быть связано с их разрушением или выходом их содержимого в гипертоническую среду. Однако наличие отростков и возможная дегрануляция в данном случае были свидетельством не активации клеток, а их спонтанной деформации. Примечательно, что похожие морфологические изменения в тромбоцитах могут возникнуть при обработке 96-процентным спиртом или лиофильном высушивании [6, 18], когда, как и в случае гипертонии, наблюдается резкое обезвоживание клеток. В клеточной биологии гипертонические растворы используются для удаления из клеток различных растворимых белковых фракций, в том числе из секреторных везикул, однако этот процесс является явно нефизиологичным. Поэтому возможный выход индукторов агрегации из гранул тромбоцитов под действием не сопровождался активацией самих клеток.

Влияние редокс-потенциала среды на активность тромбоцитов

В биологии и медицине показатель редокс-потенциала (РП) используется в качестве интегральной характеристики окислительно-восстановительных процессов в биологических объектах. Определение РП позволяет оценить баланс про- и антиоксидантных систем биологических сред и отдельных клеток, определить структурную целостность выделенных клеточных компартментов [26]. Для оценки РП чаще всего используют электрохимический метод, основанный на измерении разности потенциалов между инертным измерительным электродом, непосредственно контактирующим с биологической средой, и электродом сравнения при разомкнутой цепи [4].

В сыворотке крови практически здоровых людей значение РП платинового электрода относительно хлор-серебряного электрода сравнения чаще всего варьирует от -60 до -20 мВ, составляя в среднем -38 мВ. С другой стороны, у пациентов с септическими состояниями, испытывающими острый оксидативный стресс, величина РП составляет в среднем $+10$ мВ [1, 18]. При этом, по нашим данным, содержание

тромбоцитов с гранулами в исходной крови и БоТП здоровых людей составляет $56,6 \pm 8,7\%$, тогда как в крови пациентов с сепсисом всего $10,1 \pm 3,0\%$, то есть сдвиг РП плазмы с тромбоцитами в сторону положительных значений сопровождается снижением качества тромбоцитов. В экспериментальных условиях искусственное повышение РП БоТП с помощью ультранизких доз восстановителя Na_2S до $+20$ мВ приводит к падению числа биологически полноценных тромбоцитов (клетки с гранулами, функционально активные) в среднем на 30% , при РП $+60$ мВ — на 50% , а при РП $\geq +100$ мВ вся популяция тромбоцитов становится неактивной, при этом такие тромбоциты имеют выраженные дефекты мембранных структур и цитоскелета, не содержат гранул. Искусственное понижение РП БоТП до значений ≤ -100 мВ приводит к обратному эффекту: происходит спонтанная массовая активация тромбоцитов, которая сопровождается дегрануляцией и формированием выраженных тромбоцитарных агрегатов. В литературе описаны примеры электрокоагуляции крови, при которой на поверхности анода с высоким положительным потенциалом происходит образование тромбофибриновых сгустков, причем их диаметр варьирует в зависимости от времени и силы тока [4]. По отношению к аноду исходные кровь или БоТП выступают в качестве донора электронов; можно предположить, что в условиях РП ≤ -100 мВ этот эффект проявляется даже в отсутствие положительно заряженного анода. Известно, что интегринные белки тромбоцитов (рецепторы к коллагену и фибрину) имеют в своем составе большое количество тиоловых ($-\text{S}-\text{S}-$) и дисульфидных ($-\text{SH}$) групп, баланс которых определяет функциональное состояние рецептора [32]. При адгезии или агрегации тромбоцитов возрастает активность дисульфидизомеразы, восстанавливающей $-\text{S}-\text{S}-$ связи в составе интегринных белков, что ведет к их перестройке, способствуя связыванию тромбоцитов с субстратом [32]. Похожий эффект можно также получить в условиях избытка $-\text{SH}$ групп,

в частности, с использованием антиоксиданта глутатиона [21]. Таким образом, при значениях РП плазмы -100 мВ и ниже заметно повышаются восстановительные свойства среды, что является стимулятором активации поверхностных рецепторов тромбоцитов, а затем и самих тромбоцитов. Это необходимо учитывать при электрохимическом исследовании образцов БоТП, а также при исследовании взаимодействия тромбоцитов с различными средами и субстратами.

Белки — неканонические кофакторы активации тромбоцитов

Благодаря успехам биотехнологии и молекулярной инженерии сегодня есть возможность проведения экспериментальных работ с использованием большого числа специфических белков. Чаще всего используются белки, стимулирующие активацию клеток или их трансформацию. Среди этой группы большой интерес вызывают белки Wnt в связи с их про-онкогенными свойствами. Показано, что клетки меланомы, экспрессирующие на своей поверхности белки Wnt5a, являются высокоаффинными для тромбоцитов человека, и при контакте с ними запускают характерную реакцию агрегации. Считается, что агрегация тромбоцитов облегчает инвазию опухолевых клеток внутрь сосудов, а также дополнительно стимулирует рост меланомы [24]. При этом выделенный Wnt5a в 2–3 раза усиливает интенсивность агрегации тромбоцитов БоТП под действием малых доз коллагена или тромбоксана; показано, Wnt5 запускает передачу внутриклеточных сигналов по PI3K/Akt-пути, который в тромбоцитах стимулирует активацию циклооксигеназы и синтез тромбоксана A2 [23, 27, 30]. Стоит особо подчеркнуть, что в условиях очень низких доз коллагена увеличение количества Wnt5 в БоТП пропорционально увеличивает агрегационную активность тромбоцитов, измеряемую оптическим способом [28, 30]. В то же время использование одного только Wnt5 без дополнительных агонистов не способно вызвать

агрегацию, то есть *in vitro* Wnt5 выступает не как индуктор агрегации тромбоцитов, а как весьма мощный ко-фактор, который позволяет активировать тромбоциты даже при очень низких дозах стандартных агонистов. Все же использование Wnt5 в области практических разработок с применением тромбоцитов заметно ограничено его высокой стоимостью. Более доступными неканоническими ко-факторами активации представляются белки из семейства лектинов, в первую очередь галектины, избирательно связывающиеся с углеводами, обогащенными бета-галактозой. Установлено, что галектины-1 и -8 обладают способностью избирательно связываться с тромбоцитарным рецептором GP Ib/IX/V, который в норме образует связь с фактором Виллебранда (vWF), то есть галектины-1/-8 могут выступать в качестве аналога vWF. Это позволяет тромбоцитам агрегировать даже в условиях полного отсутствия vWF [35]. Кроме того, галектины-1, -3 и -8 стимулируют переход рецептора фибриногена $\alpha_{IIb}\beta_3$ в активное состояние, экспрессию P-селектина [37], которая приводит тромбоциты в состояние необратимой активации. В норме галектины ассоциированы с волокнами межклеточного матрикса [35–37], встречаются во многих соединительных тканях и, по всей видимости, участвуют в качестве «внешнего» стабилизатора клеточного звена гемостаза: так, у мышей с неработающим геном галектина-1 наблюдаются удлинение времени кровотечения, снижение агрегационной активности [28]. С другой стороны, высокая способность галектинов связывать углеводные фрагменты может быть причиной развития различных воспалительных реакций за счет образования гетерогенных агрегатов из тромбоцитов и лейкоцитов, а также может стимулировать развитие тромботических и атеросклеротических осложнений [28]. В качестве факторов, снижающих избыточную активность галектинов, применяют блокаторы $\alpha_{IIb}\beta_3$ -, АДФ-рецепторов, а также циклооксигеназы [15, 35], то есть различные препараты-антиагреганты. Помимо

галектинов, тромбоцит-активирующими свойствами обладают растительные лектины, такие как фитогемагглютинин Р, лектин зародышей пшеницы (WGA), конканавалин А, лектин омелы белой [15, 36]. Необходимо подчеркнуть, что в условиях высокого содержания лектинов усиливается взаимодействие не только между тромбоцитами, но и между другими циркулирующими клетками, поэтому использование применения лектинов для нормализации гемостаза в клинической практике должно сопровождаться подробным мониторингом. Тем не менее замечательная способность лектинов усиливать адгезивную способность тромбоцитов имеет безусловный интерес в области биотехнологий.

Все изложенные факты указывают на то, что тромбоцит представляет собой чрезвычайно чувствительную биологическую систему, активация которой может быть вызвана факторами, не связанными напрямую с гемостазом, адгезией, и др. стандартными сигнальными путями. В результате стоит по-новому оценить те случаи в научной и клинической практике, когда активация тромбоцитов является спонтанной и «незапланированной», то есть оценка качества тромбоцитов должна подразумевать вероятность изменения клеток под действием неканонических факторов. Вместе с тем неканонические пути активации тромбоцитов представляют большой интерес для научно-практических исследований, позволяют разрабатывать новые подходы к изучению тромбоцитов и их применению в области биологии, медицины и биоинженерии.

Список литературы

1. Андреев В. Н., Евсеев А. К., Гараева Г. Р., Гольдин М. М. Сопоставление редокс-потенциала и антиоксидантной активности сыворотки крови. // Молекулярная медицина. — 2013. — № 4. — С. 37–40.
2. Ваваев А. В., Бурячковская Л. И., Тищенко Е. Г., Учитель И. А., Максименко А. В. Антиоксидантное и антиагрегационное действие ковалентного биферментного конъюгата супероксиддисмутазы-хондроитинсульфат-каталаза на тромбоциты. Биомедицинская химия. — 2012. — Т. 58, № 3. — С. 300–309.
3. Высочин И. В., Кобзева Е. Н., Макаров М. С., Глухов А. С., Тюрин И. А., Ключев А. Е., Хватов В. В. Заготовка и клиническое приме-

нение криоконсервированных эритроцитов и тромбоцитов. // Альманах клинической медицины. — 2014. — № 30. — С. 70–75.

4. Евсеев А. К., Пинчук А. В., Андреев В. Н., Гольдин М. М. Анализ зависимостей потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи от времени в сыроворотке крови. // Физикохимия поверхности и защита материалов. — 2014. — Т. 50, № 4. — С. 445–448.
5. Гулякин И. Д., Оборотова Н. А., Печеников В. М. Солюбилизация гидрофобных противоопухолевых препаратов (обзор). // Химико-фармацевтический журнал. — 2014. — № 3. — С. 46–50.
6. Коробова Ф. В., Левина Т. Н., Соколинский Б. З. и соавт. Сравнительное исследование тромбоцитов здоровых лиц с использованием световой микроскопии и проточного счетчика Cobas Micros 18 OT. // Клин. лаб. диагн. — 2000. — № 12. — С. 21–24.
7. Максименко А. В., Ваваев А. В., Бурячковская Л. И., Мох В. П., Учитель И. А., Лакомкин В. А., Капелько В. И., Тищенко Е. Г. Биофармакология ферментных конъюгатов: Вазопротекторная активность супрамолекулярного производного супероксиддисмутазы-хондроитинсульфат-каталаза. // Acta Naturae. — 2010. — Т. 2, № 4. — С. 90–103.
8. Лойко Е. Н., Самаль А. Б., Шуляковская С. М. Обратимое ингибирование АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов перекисью водорода. // Вестн. НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. — 2003. — № 2. — С. 97–100.
9. Лойко Е. Н., Самаль А. Б., Шуляковская С. М. H₂O₂-индуцированная агрегация тромбоцитов и увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺ блокируются ингибиторами внутриклеточной сигнализации. // Биохимия. — 2003. — Т. 68. — № 11. — С. 1506–1510.
10. Макаров М. С., Хватов В. Б., Боровкова Н. В. Иммуобилизация тромбоцитов человека на адгезивных субстратах с помощью тикагрелора. // Материалы VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (часть 1). — М. 2015, С. 243–245.
11. Киричук В. Ф., Булкина Н. В., Китаева В. Н., Парфенова С. В., Значение гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов в нарушении микроциркуляторного звена гемостаза у больных хроническим генерализованным пародонитом. // Российский стоматологический журнал. — 2007. — № 5. — С. 17–20.
12. Сазонтова Т. Г., Архипенко Ю. В. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов — равнозначных участников метаболизма. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2007. — № 3. — С. 2–18.
13. Самаль А. Б., Черенкевич С. Н., Хмара Н. Ф. H₂O₂-индуцированная агрегация и дезагрегация тромбоцитов. // Гематология и трансфузиология. — 1988. — Т. 33, № 11. — С. 34–37.
14. Самаль А. Б., Хмара Н. Ф., Черенкевич С. Н. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы. — Минск: Университетское, 1990, 104 с.

15. Самалъ А.Б., Тимошенко А.В., Лойко Е.Н., Кальтнер Г., Габиус Г.— И. Образование лактозорезистентных агрегатов тромбоцитов под действием лектина омелы белой и различные сигнальные ответы клеток на лектин и тромбин. // Биохимия.— 1998.— Т. 63.— С. 611–619.
16. Сеньчукова Г.В. Обоснование состава и стандартизация лекарственных форм, содержащих димексид. // Автореферат диссертации... канд. фармацевт. наук; Пятигорск, 2001.— 22 с.
17. Трегубова И. А., Косолапов В. А., Спасов А.А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы. // Успехи физиологических наук.— 2012.— Т. 43, № 1.— С. 75–94.
18. Хубутя М. Ш., Евсеев А. К., Колесников В. А., Гольдин М. М., Давыдов А. Д., Волков А. Г., Степанов А. А. Измерения потенциала платинового электрода в крови, плазме и сыворотке крови. // Электрохимия.— 2010.— Т. 46, № 5.— С. 569–573.
19. Bode A. P., Read M. S. Lyophilized platelets: continued development. // *Transfus Sci.*— 2000.— Vol. 22, № 1–2.— P. 99–105.
20. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. // *Nature.*— 2001.— Vol. 414.— P. 813–820.
21. Dayal S., Wilson K. M., Motto D. G., Miller F. J. Jr., Chauhan A. K., Lentz S. R. Hydrogen peroxide promotes aging-related platelet hyperactivation and thrombosis. // *Circulation.*— 2013.— Vol. 127, № 12.— P. 1308–1316.
22. Essex D. W., Li M. Redox control of platelet aggregation. // *Biochemistry.*— 2003.— Vol. 42, № 1.— P. 129–136.
23. Felfelming-Borhm, D. Early detection of preeclampsia by determination of platelet aggregability. // *Tromb. Res.*— 2000.— Vol. 98, № 2.— P. 139–146.
24. Gupta G. P., Massague J. Cancer metastasis: building a framework. // *Cell.*— 2006.— Vol. 127.— P. 679–695.
25. Hoover E. L., Ross M. J., Fani K., Adams C. Z. Jr., Debons A. F. The effects of dimethyl sulfoxide on aortic prostacyclin production and serum thromboxane and plasma fibrinogen levels in rabbits fed a normal versus a cholesterol-enriched diet. // *Surgery.*— 1991.— Vol. 109, № 1.— P. 69–75.
26. Jones D. P. Redox sensing: Orthogonal control in cell cycle and apoptosis signaling. // *J. Intern. Med.*— 2010.— Vol. 268, № 5.— P. 432–448.
27. Kim S. Y., Kim S., Yun-Choi H. S., Jho E. H. Wnt5a potentiates U46619-induced platelet aggregation via the PI3K/Akt pathway. // *Mol. Cells.*— 2011.— Vol. 32, № 4.— P. 333–336.
28. Leffler H. Galectins structure and function—a synopsis. // *Results Probl. Cell Differ.*— 2001.— Vol. 33.— P. 57–83.
29. Li Z., Zhang G., Le Breton G. C., Gao X., Malik A. B., Du X. Two waves of platelet secretion induced by thromboxane A2 receptor and a critical role for phosphoinositide 3-kinases. // *J. Biol. Chem.*— 2003.— Vol. 278.— P. 30725–30731.
30. Lox C. D., Frederick N., Heine M. W. The effect of topical dimethyl sulfoxide on clotting activity in the Sprague-Dawley rat. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1983.— Vol. 411.— P. 340–343.
31. Michelson A. D. Platelets. 3rd ed.— Amsterdam: Academic Press, 2013, 1351 p.
32. Murphy D. D., Reddy E. C., Moran N., O'Neill S. Regulation of platelet activity in a changing redox environment. // *Antioxid Redox Signal.*— 2014.— Vol. 20, № 13.— P. 2074–2089.
33. Pollard M. D., Earnshaw W. C. // *Cell Biology*— NY, Elsevier Science, 2007, 920 p.
34. Pratico D., Iuliano L., Ghiselli A., Alessandri C., Violi F. Pratico, D. Hydrogen peroxide as trigger of platelet aggregation. // *Haemostasis.*— 1991.— Vol. 21.— P. 169–174.
35. Romaniuk M. A., Tribulati M. V., Cattaneo V., Lapponi M. J., Molinas F. S., Oscar Campetella O., Schattn M. Human platelets express and are activated by galectin-8. // *Biochem.*— J. 2010.— Vol. 432.— P. 535–547.
36. Schattner M. Platelets and galectins. // *Ann Transl Med.*— 2014.— Vol. 2, № 9.— P. 85–102.
37. Sugiya H., Matsuki-Fukushima M., Hashimoto S. Role of aquaporins and regulation of secretory vesicle volume in cell secretion. // *J. Cell Mol. Med.*— 2008.— Vol. 12, № 5A.— P. 1486–1494.
38. Valeri C. R., Macgregor H., Ragno G. Correlation between in vitro aggregation and thromboxane A2 production in fresh, liquid-preserved, and cryopreserved human platelets: effect of agonists, pH, and plasma and saline resuspension. // *Transfusion.*— 2005.— Vol. 45.— P. 596–603.



Всероссийская научно-практическая конференция НОВЫЕ МЕТОДЫ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ В МЕДИЦИНЕ, ФАРМАЦИИ, ВЕТЕРИНАРИИ И ЭКОЛОГИИ

15-16 октября 2015

Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова



МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ

Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова (Санкт-Петербург, Большой Сампсониевский проспект, д. 1, ст. м. «Площадь Ленина»)

ОРГАНИЗАТОРЫ КОНФЕРЕНЦИИ

- Министерство обороны Российской Федерации
- Главное военно-медицинское управление МО России
- Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова
- Общественная организация «Человек и его здоровье»

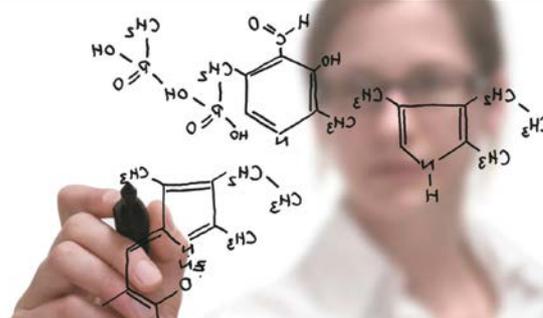
ПРЕДСЕДАТЕЛЬ ОРГКОМИТЕТА КОНФЕРЕНЦИИ

Начальник Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова, заслуженный врач России, профессор, генерал-майор медицинской службы Бельских Андрей Николаевич

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ ОРГКОМИТЕТА

Профессор кафедры микробиологии Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова, доктор медицинских наук Малышев Владимир Васильевич

По всем вопросам и условиям участия в рамках конференции Вы сможете проконсультироваться:
www.congress-ph.ru



ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ КОНФЕРЕНЦИИ

- Экспресс-диагностика микроорганизмов и их маркеров в медицине
- Экспресс-диагностика микроорганизмов и их маркеров в фармации
- Экспресс-диагностика микроорганизмов и их маркеров в ветеринарии
- Экспресс-диагностика микроорганизмов и их маркеров в экологии
- Общие вопросы экспресс-диагностики микроорганизмов и их маркеров. Новации в приборном парке и реагентах для экспресс-диагностики микроорганизмов

МедСервис

Анализатор газов крови,
электролитов, метаболитов



*Доступный.
Надежный.
Мобильный.*

СИСТЕМА АНАЛИЗА Epos System

Изменяемый параметр	Ед. измер.	Диапазон измерения
pH	pH units	6.5-8.0
PCO ₂	mmHg	5-250
PO ₂	mmHg	5-750
Na	mmol/L	85-180
K	mmol/L	1.5-12
iCa	mmol/L	0.25-4
Glu	mg/dL	20 - 700
Lact	mmol/L	0.30-20.00
Hct	%PCV	10-75
Cl ⁻	mmol/l	65-140
Crea	mg/dl	0,30-15,00

Расчетный параметр	Ед. измер.	Диапазон измерения
TCO	mmol/L	1-85
HCO ₃	mmol/L	1-85
BE efc	mmol/L	-30...+30
BE b	mmol/L	-30...+30
sO ₂	mmol/L	0-100
Hb	%	3.3-25
AGap	mmol/l	-14 - +95
AGapK	mmol/l	-10 - +99
eGFR	ml/min /1,73м ²	2 - 60 или >60
eGFR-a	ml/min /1,73м ²	2 - 60 или >60

- Точные результаты у постели больного через 35 секунд
- Использование технологии SMART CARD (измерительные карты с встроенным чипом биосенсоров)
- Хранение измерительных карт при комнатной температуре
- Длительные сроки годности измерительных карт
- Эффективное использование расходных материалов – расход только в момент измерения
- Минимизация возможности ошибки на стадии преаналитического этапа
- Всегда откалиброван и готов к работе
- Идентификация измерительных карт для гарантии качества и удобства хранения информации
- Автоматическая калибровка и контроль качества системы
- Беспроводная связь Wi-Fi и Bluetooth – широкие коммуникативные возможности
- Значительное время работы от аккумуляторов без подзаряда системы
- Возможность распечатки результатов на портативный и стационарный принтер



МедСервис

Россия, Москва
ул. Дербеневская, д.20, стр.32
Т / П "Кожевники"

Телефон: +7 (495) 633-23-53
+7 (495) 633-23-52
+7 (495) 633-24-34
+7 (495) 633-23-26

Факс: +7 (495) 633-26-16
E-mail: office@medservice.biz
www.medservice.info

Alere, Inc.
Warehouse, Distribution
1-57 Iber Road, Ottawa, Ontario K2S 1E7
Phone: (613) 271-1144

Epocal Inc.
Manufacturing, R&D
2080 Walkley Road, Ottawa, ON K1G 3P5
Phone: (613) 738-6192
www.epocal.com



Экспресс-диагностика нарушений гомеостаза на различных этапах реконструктивных оперативных вмешательствах на инфраренальном отделе аорты

А. Н. Грицай, к.м.н., преподаватель кафедры (клиники) анестезиологии и реаниматологии²

И. А. Сокорнов, врач анестезиолог-реаниматолог¹

В. Н. Лапшин, д.м.н., проф., рук. отдела анестезиологии и реаниматологии¹

А. В. Щеголев, д.м.н., начальник кафедры (клиники) анестезиологии и реаниматологии²,
гл. анестезиолог-реаниматолог Минобороны России

А. В. Суховецкий, к.м.н., преподаватель кафедры (клиники) анестезиологии и реаниматологии²

¹ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И. И. Джанелидзе», г. Санкт-Петербург

²ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Минобороны России, г. Санкт-Петербург

Rapid diagnosis of disorders of homeostasis at different stages of reconstructive surgeries on the infrarenal aorta

A.N. Gritzay, I.A. Sokornov, V.N. Lapshin, A.V. Shchyogolev, A.V. Sukhovetskiy

The Saint Petersburg Scientific and Research Institute for Emergency Care n. a. I. I. Dzhanelidze, the Military Medical Academy n. a. S. M. Kirov, Saint Petersburg, Russia

Резюме

В статье представлены данные анализа изменения кислотно-основного состояния и уровня K^+ сыворотки крови у больных, подвергшихся оперативному вмешательству на инфраренальном отделе аорты. Выявленные сдвиги кислотно-основного состояния были обусловлены пережатием аорты на момент выполнения аорто-бедренного бифуркационного шунтирования с последующим восстановлением кровотока в нижележащих отделах тела и развитием реперфузионного синдрома. Характер нарушений сдвигов кислотно-основного состояния оценивали портативным газоанализатором Istat непосредственно в операционной, что позволяло оперативно выполнять коррекцию возникших нарушений. Достоверность полученных данных, а также преимущества и недостатки использования портативного аппарата оценивали на основании сравнения с данными, полученными при анализе второй пробы крови на стационарном газовом анализаторе Cobas b 221 Roche, расположенном в диагностической лаборатории, и времени, затраченного на получение данных в первом и во втором случаях.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, анестезиологическое пособие, оперативное вмешательство, инфраренальный отдел аорты.

Summary

The article presents the analysis of changes in acid-base status and level To^+ serum in patients undergoing surgical intervention for infraphylum the aorta. Identified shifts in acid-base status were due to compression of the aorta at the time of execution of the aortofemoral bifurcation bypass surgery with subsequent restoration of blood flow in the underlying compartments of the body and the development of reperfusion syndrome. The nature of the violations of shifts in acid-base status was assessed with a portable gas analyzer (Istat directly in the operating room, which allowed them to promptly correct violations occur. The reliability of the obtained data, as well as the advantages and disadvantages of using a portable apparatus was evaluated on the basis of comparison with the data obtained in the analysis of the 2nd blood sample for stationary gas analyzer Cobas b 221 Roche, located in the diagnostic laboratory and the time spent retrieving the data in the first and second cases.

Key words: laboratory diagnosis, anesthetic, surgery, infrarenal aorta.

Актуальность исследования

Необходимость динамической оценки и своевременной коррекции гомеостаза у пациентов в критическом состоянии обусловлена развитием недостаточности кровообращения, нарушением кислородтранспортной функции крови, расстройством микроциркуляции, реперфузионным синдромом и эндотоксикозом [2, 6, 7, 8, 9]. Такие нарушения часто встречаются при травматическом шоке, синдроме длительного сдавления, во время выполнения больших оперативных

вмешательств, в том числе на аорте и магистральных артериях нижних конечностей [1, 3, 4, 5].

Помимо своевременного восстановления транспорта кислорода, большое значение имеет нормализация буферной емкости крови, нарушения которой оказывают дополнительное отрицательное влияние на сердечно-сосудистую, дыхательную систему и функцию почек [6, 8, 10]. Для оценки текущего состояния гомеостаза, во время оперативных вмешательств и в палатах интенсивной терапии наиболее ценной

является информация, полученная на основе использования портативных анализаторов критических состояний. Вместе с тем есть мнение, что аппараты данной категории не обладают достаточной прецизионностью [11].

Цель исследования

Оценка газового и электролитного состава, а также кислотно-основного состояния крови на различных этапах хирургического лечения больных при операциях на инфрареналь-

Таблица 1
Динамика изменений показателей ВЕ в I группе на этапах исследования

Этапы	Q25	Me	Q75
1	-7,8	-6	-5
2*	-6	-3	-2
3*	-8	-7	-5,27
4*	-4	-3	-0,5

$p_{1-2}=0,003$, $Z=-3,015$; $p_{2-3}=0,003$, $Z=-2,96$; $p_{3-4}=0,001$, $Z=-3,43$ (* — достоверные различия по сравнению с предыдущим этапом исследования).

Таблица 2
Динамика изменений показателей ВЕ во II группе на этапах исследования

Этапы	Q25	Me	Q75
1	-7	-5	-4,25
2*	-5	-2,5	-1,0
3*	-8	-7	-6,0
4*	-3	-3	-0,25

$p_{1-2}=0,008$, $Z=-2,64$; $p_{2-3}=0,002$, $Z=-3,14$; $p_{3-4}=0,001$, $Z=-3,48$ (* — достоверные различия по сравнению с предыдущим этапом исследования).

ном отделе аорты с проведением сравнительного анализа результатов, полученных экспресс-методом непосредственно в операционной и в клинично-диагностической лаборатории стационара.

Материал и методы

В исследование включены 16 пациентов-мужчин в возрасте от 58 до 82 лет (в среднем 69 ± 7 лет) с риском анестезии IV класса по классификации ASA, которым была выполнена резекция аневризмы инфраренального отдела аорты с последующим протезированием бифуркации. Всем пациентам проводили сочетанную анестезию: эпидуральная (катетеризацией эпидурального пространства на уровне Th_7 – Th_8) и общая комбинированная анестезия с интубацией трахеи и ИВЛ. Премедикация осуществлялась в условиях операционной дробным внутривенным введением мидазолама в средней дозе 2,5–5 мг. Индукцию анестезии проводили введением тиопентала Na^+ из расчета 4–8 мг/кг массы тела и фентанила 5–7 мкг/кг. Миоре-

лаксацию во время индукции анестезии обеспечивали введением листенона 1,5–2 мг/кг массы тела с прекураризацией вероипекуронием в дозе 1 мг. Поддержание миорелаксации в ходе оперативного вмешательства осуществляли введением вероипекурония по 2 мг каждые 40–60 минут. Сенсорный блок достигали дробным введением в эпидуральное пространство 0,5% маркаина в средней дозе 40–60 мг. Поддержание анестезии осуществляли ингаляцией смеси N_2O и O_2 в соотношении 2 : 1 мидазоламом (2,5–5 мг) и фентанилом (0,1 мг), кратность внутривенного введения которых определялась с учетом данных интраоперационного мониторинга артериального давления, частоты сердечных сокращений, сатурации, содержания углекислого газа в конечной порции выдыхаемого воздуха, ЭКГ, температуры тела, величины энтропии и текущими параметрами механики дыхания. Дополнительно состояние гемодинамики оценивали на основании инвазивного измерения артериального давления во время операции.

Для анализа характера изменений pH, $PaCO_2$, ВЕ и уровня K^+ осуществляли забор двух проб артериальной крови на следующих этапах оперативного вмешательства: 1) до пережатия аорты, 2) во время пережатия аорты, 3) непосредственно после восстановления кровотока и 4) через 30 минут после запуска кровотока.

В первой пробе (группа I) вышеуказанные показатели определяли экспресс-методом (анализатор критических состояний Abbott iStat 300, США). Вторую пробу крови (группа II) отправляли одновременно в биохимическую лабораторию и анализировали в ней выбранные показатели на стационарном газовом анализаторе cobas b 221 Roche (Германия). Полученные данные на каждом этапе исследования сравнивали с предыдущим этапом внутри каждой группы. Для оценки погрешности работы аппарата iStat сравнивали полученные результаты между I и II группами на каждом этапе оперативного вмешательства в отдельности. Помимо этого, фиксировали время, затрачен-

ное на анализ проб крови на портативном и стационарном анализаторах.

Для статистической обработки данных использовались метод парных сравнений Wilcoxon и тест Mann Whitney для непарных выборок. Данные статистического анализа представлены в виде среднего значения и ошибки средней в выборке ($M \pm m$), медианы в переменной выборке (Me, Q_{25} , Q_{75}) и достоверности различий средних (p).

Результаты исследования

Сравнительный анализ результатов, полученных на портативном (I группа: iStat) и стационарном (II группа: cobas b 221) газоанализаторах продемонстрировал однонаправленные изменения исследуемых показателей КОС, газового состава и уровня K^+ крови. Анализ показателей средних значений pH, PCO_2 , ВЕ артериальной крови в начале операции (I этап) указывал на наличие субкомпенсированного метаболического ацидоза как в первой, так и во второй группах ($pH = 7,32 \pm 0,01$, $PCO_2 = 39,01 \pm 0,65$ мм рт. ст., $BE = -6,19 \pm 0,53$ и $pH = 7,34 \pm 0,01$, $PCO_2 = 38,61 \pm 0,40$ мм рт. ст., $BE = -5,63 \pm 0,46$) соответственно, обусловленного, по всей видимости, сниженным кровотоком в ишемизированной области.

Уменьшение дефицита оснований на втором этапе исследования в обеих группах может быть связано с выключением кровотока в ишемизированной области (табл. 1 и 2).

Однако существенных изменений значений pH и $PaCO_2$ на втором этапе операции как в первой, так и во второй анализируемой группе не выявлено.

После восстановления кровотока (на третьем этапе исследования) в обеих группах отмечалось развитие декомпенсированного метаболического ацидоза, в связи с чем для предупреждения развития реперфузионного синдрома осуществлялась его коррекция введением 3-процентного раствора $NaHCO_3$. Через 30 минут после запуска кровотока показатели КОС в обеих группах практически нормализовались (табл. 1 и 2).

Таблица 3
Динамика изменений показателей K^+ сыворотки в I группе на этапах исследования

Этапы	Q25	Me	Q75
1	3,53	3,95	4,35
2	3,82	4,1	4,35
3*	4,20	4,4	4,68
4*	3,90	4,0	4,1

$p_{1-2}=0,18$, $Z=-1,34$; $p_{2-3}=0,001$, $Z=-3,42$; $p_{3-4}=0,001$, $Z=-3,45$ (* — достоверные различия по сравнению с предыдущим этапом исследования).

Таблица 4
Динамика изменений показателей K^+ сыворотки во II группе на этапах исследования

Этапы	Q25	Me	Q75
1	3,80	3,95	4,20
2	4,15	4,30	4,50
3*	4,33	4,60	4,80
4*	4,10	4,20	4,30

$p_{1-2}=0,017$, $Z=-2,39$; $p_{2-3}=0,001$, $Z=-3,32$; $p_{3-4}=0,001$, $Z=-3,41$ (* — достоверные различия по сравнению с предыдущим этапом исследования).

Средние значения уровня K^+ крови в первой группе составили $3,9 \pm 0,16$ ммоль/л, а во второй группе — $4,0 \pm 0,12$ ммоль/л. На этапе запуска кровотока отмечалось повышение уровня K^+ , обусловленное, по всей вероятности, увеличением его концентрации в зоне ишемии. К концу операции его концентрация вновь уменьшалась. В обоих случаях на всех этапах исследования концентрация K^+ оставалась в пределах нормы (табл. 3 и 4).

Сравнительный анализ данных рН между I и II группой на каждом этапе исследования достоверных различий не выявил (рис. 1).

Аналогичные данные были получены при сравнении ВЕ, $PaCO_2$, за исключением уровня K^+ сыворотки крови, среднее значение которого оставалось в пределах нормы (рис. 2, 3, 4).

Среднее время, затраченное на получение результатов анализов в первой группе, составило $6,4 \pm 1,2$ минуты, тогда как во второй — $19,2 \pm 2,5$ минуты, что делает целесообразным использование портативных анали-

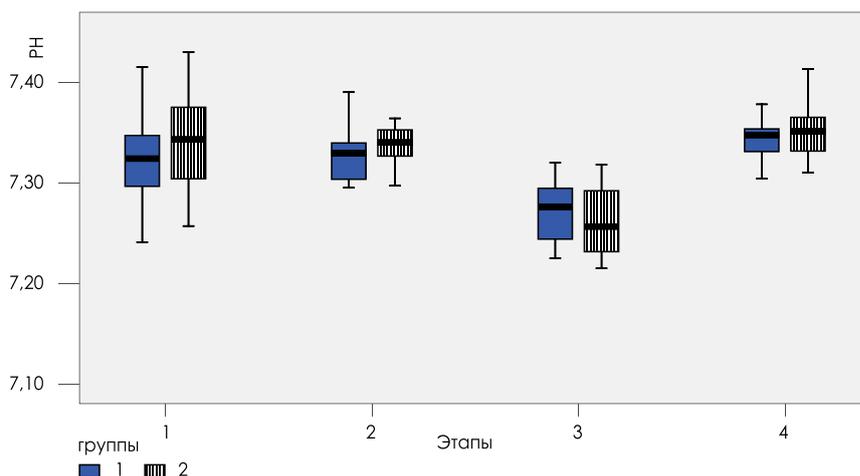


Рисунок 1. Сравнительный анализ рН на исследуемых этапах (Me, Q25, Q75); $p_{1-(II)}=0,24$, $p_{2-(II)}=0,24$, $p_{3-(II)}=0,54$, $p_{4-(II)}=0,34$.

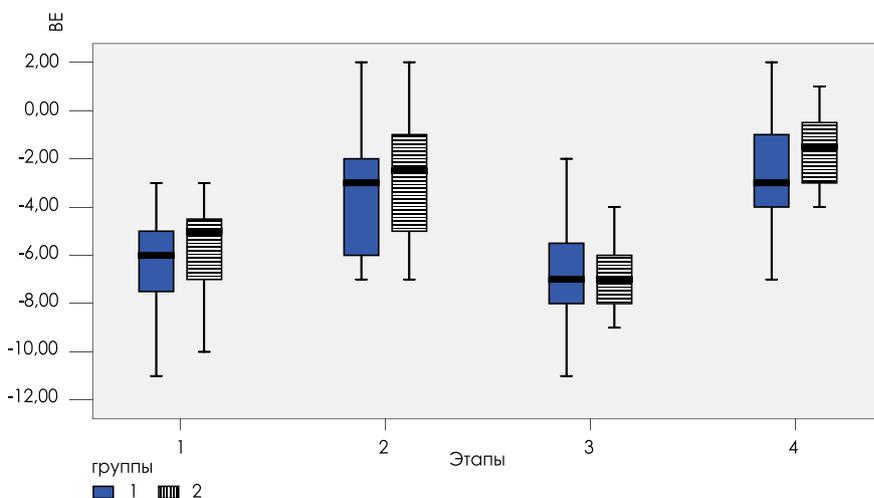


Рисунок 2. Сравнительный анализ ВЕ на исследуемых этапах (Me, Q25, Q75); $p_{1-(II)}=0,56$, $p_{2-(II)}=0,65$, $p_{3-(II)}=0,86$, $p_{4-(II)}=0,23$.

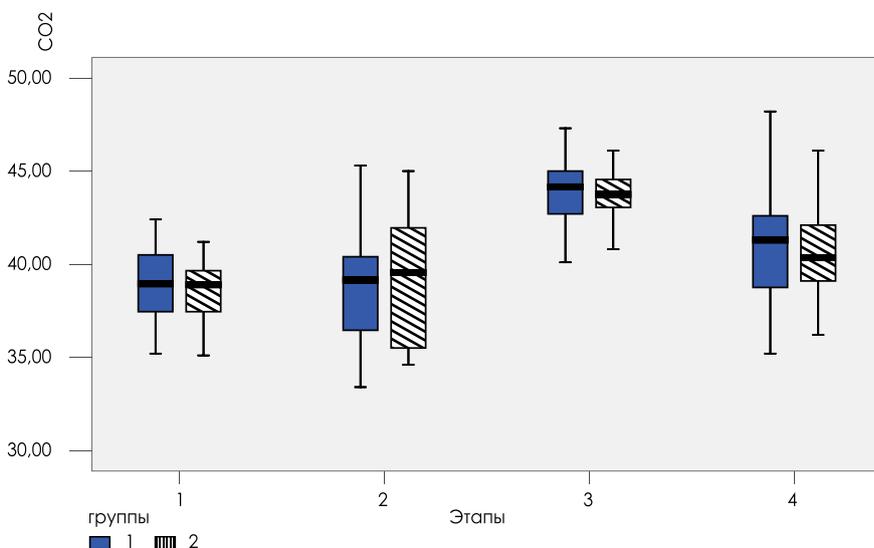


Рисунок 3. Сравнительный анализ $PaCO_2$ на исследуемых этапах (Me, Q25, Q75); $p_{1-(II)}=0,73$, $p_{2-(II)}=0,81$, $p_{3-(II)}=0,68$, $p_{4-(II)}=0,64$.

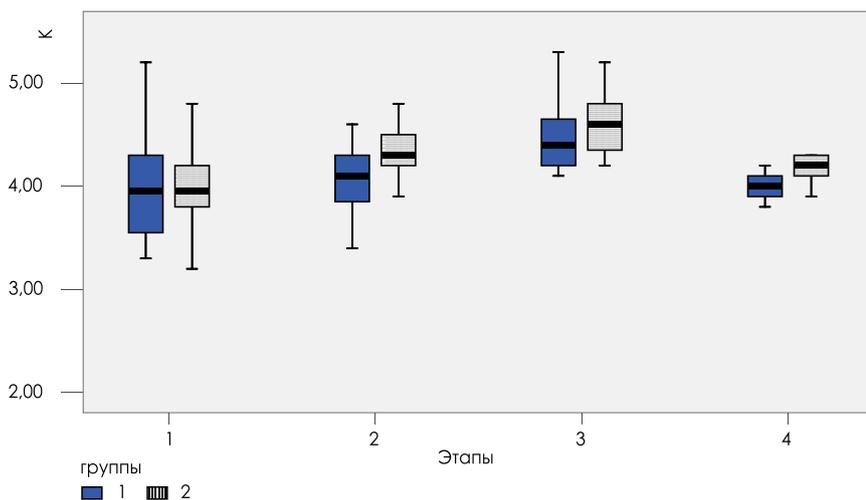


Рисунок 4. Сравнительный анализ уровня K^* на исследуемых этапах (Me, Q25, Q75); $p_1=0,84_{(1-2)}$, $p_2=0,07_{(1-3)}$, $p_3=0,15_{(1-4)}$, $p_4=0,01^*_{(1-4)}$ — достоверные различия в исследуемых группах).

затов в критических ситуациях, требующих незамедлительного принятия решения о необходимости коррекции возникших нарушений.

Выводы

1. При реконструктивных оперативных вмешательствах на интра-ренальном отделе аорты после восстановления кровотока в ишемизированной зоне были выявлены существенные изменения КОС крови, характерные для развития реперфузионного синдрома, проявляющиеся развитием декомпенсированного метаболического ацидоза.
2. Сравнительный анализ данных, полученных при использовании портативного и стационарного анализатора, свидетельствует о практически полном соответ-

ствия полученных результатов при интраоперационном определении анализируемых параметров гомеостаза на различных этапах хирургического вмешательства у больных с высоким операционно-анестезиологическим риском.

3. Интраоперационный экспресс-анализ параметров гомеостаза при травматичных оперативных вмешательствах, сопровождающихся значительной кровопотерей, позволяет существенно сократить время на диагностику и оперативно скорректировать терапию выявленных нарушений.

Список литературы

1. Гавриленко А. В. Реперфузионный синдром в реконструктивной хирургии сосудов нижних конечностей. // А. В. Гавриленко, И. И. Дементьева, Е. Д. Шабалас. // *Анналы хирургии.* — 2002. — № 3. — С. 19–22.

2. Дерябин И. И., Насонкин О. С. Травматическая болезнь. — Л.: Медицина, 1987. — 304 с.
3. Зимон И. Н. Дыхательные расстройства у больных с острой артериальной непроходимостью и ишемическим синдромом нижних конечностей. // И. Н. Зимон, Н. А. Мавлянова. // *Хирургия.* 1997. — № 7. — С. 16–18.
4. Нечаев Э. А., Ревской А. К., Савицкий Г. Г. Синдром длительного сдавления: Руководство для врачей. М. Медицина, 1993. — 208 с.
5. Adembri C., Domenici L.L., Formigli L., Brunelleschi S. Ischemia-reperfusion of human skeletal muscle during aortoiliac surgery: effects of acetylcarnitine. // *Histol. Histopathol.* — 1994. V. 9, № 4. — P. 683–690.
6. Ataka K., Chen D., Levitsky S., Jimenez E., Feinberg H. Effect of aging on intracellular Ca^{2+} , intracellular pH, and contractility during ischemia and reperfusion. // *Circulation.* 1992. — V. 86. — № 5 (Suppl. II). — 371–376.
7. Blaisdell F. William. The Pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome. // *Congress of the mediterranean league of angiology and vascular surgery.* — 1999.
8. Turnage R. H., Cuice K. S., Oldham K. T. Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion. *J. Surg. Res* 1994 Jun; 56 (6): 56 (6): 571–8.
9. Menzes J. M., Hierhofer C., Walking S. C. et al. The modulation of hepatic injury and heat shock expression by inhibition of inducible nitric oxide synthase after hemorrhagic shock. // *Shock* 2002. Vol. 17 № 1. P. 13–18.
10. Mehta P. M., Kloner R. A. Effects of acid-base disturbance, septic shock, and calcium and phosphorous abnormalities on cardiovascular function. *Crit. Care Clin.* 1987; 3: 747–758.
11. CLSI. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. CLSI document EP9-A [ISBN 1–56238–283–7]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087–1898, USA 1995.



РОССИЙСКАЯ АССОЦИАЦИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Конференции и выставки

Научно-образовательный форум «Лабораторная медицина России: современные технологические решения, клиническая ценность новейших биомаркеров, организационные проблемы» и специализированная выставка «МедЛабТех-2015»

Время проведения: 21–22 октября 2015 года.

Место проведения: г. Воронеж, пл. Детей, д. 1, Дворец творчества детей и молодежи.

Организатор: РАМЛД.

Российская ассоциация медицинской лабораторной диагностики

Адрес: 119526, Россия, Москва, а/я 117
E-mail: ramld@ramld.ru

i-STAT 300 - портативный клинический анализатор



**i-STAT – выбор врача
в тех ситуациях,
когда время выполнения теста
действительно критично**



- Возможность проведения теста непосредственно у постели больного
- Первый результат тестов через 2 минуты (для газов крови и электролитов)
- Малый объем крови (от 15 до 95 мкл в зависимости от теста)
- Использование венозной, артериальной и капиллярной крови

Первый экспресс-анализатор для измерения газов крови, электролитов, кардиомаркеров, параметров биохимии и гемостаза.

Газы крови: pH, PCO₂, PO₂, TCO₂, HCO₃, BE_b, BE_{ecf}, SO₂ .

Коагуляция: ACT Celite, ACT Kaolin, PT/INR.

Иммунология: cTnI, BNP, СКМВ.

Биохимия: Глюкоза, Креатинин, Лактат, Мочевина.

Электролиты: Na, K, Cl, iCa, Anion Gap.

Гематология: Гематокрит, Гемоглобин.



О.С. Напалкова



В.Л. Эмануэль



М.А. Карпенко



Т.В. Вавилова

Тромбин как ключевой фермент гемостаза и его роль в атеросклерозе и воспалении

О.С. Напалкова, аспирант кафедры КДЛ с курсом молекулярной медицины¹, м.н.с. НИО кардиоангиологии²

В.Л. Эмануэль, д.м.н., проф., зав. кафедры КДЛ с курсом молекулярной медицины¹

С.В. Лапин, к.м.н., зав. лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний¹

М.А. Карпенко, д.м.н., проф., зам. директора по научно-лечебной работе²

Т.В. Вавилова, д.м.н., проф., зав. кафедры КДЛ²

Г.А. Березовская¹, к.м.н., с.н.с. НИЛ острого коронарного синдрома²

А.Н. Яковлев, к.м.н., зав. НИЛ острого коронарного синдрома²

В.А. Юдина, ассистент кафедры КДЛ, зав. КДЛ²

Е.Ю. Васильева, зав. ЦКДЛ, ассистент кафедры КДЛ²

¹ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» (ПСПБГМУ) Минздрава России, г. Санкт-Петербург

²ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» (СЗФМИЦ) Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Thrombin as key enzyme of hemostasis and its role in atherosclerosis and inflammation

O.S. Napalkova, V.L. Emanuel, M.A. Karpenko, T.V. Vavilova, G.A. Berезovskaya, A.N. Yakovlev, V.A. Yudina, E.U. Vasileva, S.V. Lapin

The First State Medical University of Saint-Petersburg n.a. I.P. Pavlov; the Federal North-West Medical Research Center n.a. V.A. Almazov, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

В обзоре литературы представлены данные о роли тромбина в воспалении, атеросклерозе, миграции и пролиферации клеток. Описано исследование генерации тромбина как нового диагностического маркера состояний гиперкоагуляции.

Ключевые слова: тромбин, атеросклероз, воспаление, гиперкоагуляция.

Summary

The review of literature provides data on the role of thrombin in inflammation, atherosclerosis, migration and proliferation. The thrombin generation is researched as a new diagnostic marker of hypercoagulable state.

Key words: thrombin, atherosclerosis, inflammation, hypercoagulation.

Введение

Все больше внимания в последние годы уделяется изучению функций тромбина, ключевого фермента гемостаза. Тромбин — это уникальная сериновая протеаза, которая играет главную роль в системе свертывания, регулирует тонус сосудов, участвует в клеточной пролиферации и воспалении, и других биологических процессах.

Кроме своей основной роли в каскаде коагуляции, тромбин обладает множеством дополнительных эффектов, в том числе за счет воздействия на эндотелий и сосу-

дистую стенку. Тромбин действует на эндотелий посредством ферментативного протеолиза рецепторов PAR (protease-activated receptors, англ., протеазо-активируемые рецепторы). Эти рецепторы образуются семью доменами и сопряжены с G-белком. Как было обнаружено, PAR могут регулировать NO-синтазу, фосфорилируя ее в нескольких сайтах, тем самым модулируя тонус сосудистой стенки [1]. Экспрессия этих рецепторов увеличивается под действием липополисахарида, а также провоспалительных медиаторов IL-1 α , β , TNF- α [2, 3]. Длительная

инкубация с тромбином ингибирует NO-синтазу как при прямом воздействии, так и посредством увеличения активности аргиназы на эндотелиальных клетках, вызывая сосудосуживающий эффект [4–6]. Также тромбин способствует выработке простагландина (PGH₂), тромбоксана A₂ и эндотелина-1, что приводит к вазоконстрикции [7]. Однако в здоровых артериях краткосрочное воздействие тромбином имеет обратное действие, поддерживая вазодилатацию посредством активации синтеза NO и простагландинов (PGI₂).

Помимо действия на сосудистый тонус, тромбин также регулирует миграцию, пролиферацию и гипертрофию гладкомышечных клеток (ГМК). Эти клетки экспрессируют на своей поверхности PAR-1, -2 и -4, которые также являются мишенью для тромбина [8]. Повышение экспрессии PAR-1 на ГМК *in vivo* повышает выработку трансформирующего рогового фактора бета, фактора роста тромбоцитов, серотонина [9]. Таким образом, повышение экспрессии рецепторов семейства PAR в поврежденных сосудах усиливает проатерогенные свойства тромбина.

Тромбин повышает продукцию активных форм кислорода, способствуя перекисному окислению липидов и апоптозу. Он также увеличивает индукцию про-воспалительных интерлейкинов (IL-6, IL-8), хемоаттрактантов моноцитов (MCP-1, CCL2), молекул адгезии (VCAM-1, ICAM-1), тем самым облегчая миграцию моноцитов в очаг атеросклероза [10]. Тромбин увеличивает образование м-РНК, кодирующей MCP-1, CCL2, IL-1, TNF- α на ГМК. В опытах на мышах с экспериментальным перитонитом было показано, что у животных, которым вводился ингибитор тромбина гирудин, подавлялась адгезия макрофагов в ответ на введение липолисахарида. В этой же модели внутрибрюшинное введение очищенного тромбина вызывало повышение адгезии макрофагов и увеличение концентрации IL-6 и MCP-1 [11]. Посредством повышения экспрессии на эндотелии P-, L-, E-селектинов тромбин активирует миграцию моноцитов, нейтрофилов, T- и B-лимфоцитов [12]. Тромбин активирует факторы C3 и C5 системы комплемента, которые непосредственно принимают участие в хемотаксисе воспалительных клеток [13]. Так, у пациентов со стабильной ИБС и острым коронарным синдромом (ОКС) в очагах поражения тромбин обнаруживается в высокой концентрации и выступает как провоспалительный медиатор [14, 15].

Тромбин выполняет важнейшие функции как в сосудистом, так и в тромбоцитарном гемостазе. Под действием тромбина происходит ограниченный протеолиз фибрин-мо-

номеров. Этот фермент активирует факторы V, VIII, VII, XI, XIII свертывания крови, тромбоциты, в комплексе с тромбомодулином действует на протеин С. Состояние гиперкоагуляции является патогенетическим звеном внутрисосудистого тромбоза и атеросклероза. Тромбин является важнейшим прокоагулянтным белком, который находится в центре коагуляционного каскада и поддерживает состояние гиперкоагуляции. Морфологическое исследование материала атеросклеротических бляшек выявило, что активность протромбина, X и XII факторов выше на стадии образования липидных пятен и полосок по сравнению со стабильными бляшками покрытых фиброзной капсулой. Это исследование, как утверждают его авторы, позволяет рассмотреть по-новому роль коагуляционного гемостаза в атерогенезе и атеротромбозе [16]. Тканевой фактор, экспрессированный на клетках воспаления в атеросклеротической бляшке, способен активировать тромбин, вовлекая последний в атерогенез [17–18]. У ApoE-нокаутных мышей отмечается снижение активности атеросклеротического процесса в сонных артериях после введения им прямого ингибитора тромбина мелагатрана [19]. В недавно опубликованном исследовании было обнаружено, что повышение ультразвуковой плотности бляшки, по данным доплерографии, связано с повышением генерации тромбина и не зависит от липидной структуры бляшки [20].

Все изменения в каскаде плазменного гемостаза влияют на скорость генерации и количество активного тромбина. Поэтому метод определения генерации тромбина позволяет комплексно анализировать весь каскад образования фибринового сгустка, оценивая как прокоагулянтные, так и антикоагулянтные факторы. С точки зрения информативности, этот тест представляет практический интерес для выявления состояния гиперкоагуляции. Арсенал методов лабораторной оценки системы гемостаза велик, но, к сожалению, большинство из них нечувствительны к гиперкоагуляционным состояниям. Так, показатели рутинно использу-

емых клоттинговых тестов определения активированного частичного тромбопластинового, протромбинового и тромбинового времени чаще всего остаются неизменными даже при наступлении тромбоза [21]. Уровень фибриногена, активность фактора свертывания VIII и фактора Виллебранда ассоциированы с гиперкоагуляцией, но отражают лишь отдельные компоненты в ходе активации, а не процесс в целом [22]. В лабораторной практике для оценки гиперкоагуляции используются так называемые маркеры тромбинемии: уровень D-димера, тромбин-анти-тромбиновый комплекс, фрагменты протромбина F1+2. Повышение этих показателей свидетельствует об интенсивности образования ключевого энзима гемостаза тромбина, а повышение уровня D-димера — и об интенсивности расщепления фибрина плазмином. К сожалению, перечисленные выше показатели лишь косвенно оценивают тромбинемия [23].

Непосредственное измерение концентрации тромбина это исключительно трудная лабораторная задача из-за нестойкости и короткого времени жизни фермента. Однако еще в 1953 году R. Macfarlane и R. Biggs разработали комплексный тест оценки гемостаза посредством определения генерации тромбина (ГТ) [24]. В последующем группа исследователей под руководством H. Hemker видоизменила технологию и разработала автоматизированный метод определения ГТ одновременно в нескольких образцах плазмы крови, что стандартизовало и упростило оценку результатов [25]. В основе теста генерации тромбина лежит амидолитический принцип. Для детекции образования тромбина было предложено использовать специфичный, медленно реагирующий флюорогенный субстрат — пептид, меченный 7-амино-4-метилкумарином (ZGly-Gly-Arg-AMC) [26].

Модификация теста генерации тромбина (ГТТ) с тромбомодулином (ТМ) позволяет оценить работу системы протеина С. Эквимольярный (1 : 1) комплекс тромбин-тромбомодулин не вызывает превращения фибриногена в фибрин, увеличивает инактивацию тромбина антитром-

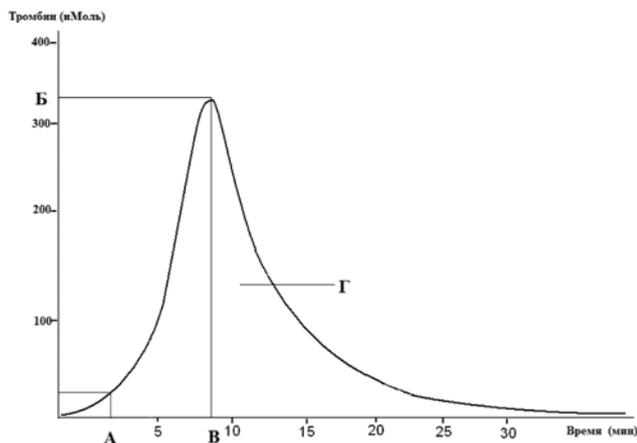


Рисунок 1. Кривая генерации тромбина и измеряемые параметры. Примечание: А — время инцициации свертывания, мин., (Lag time/LT); Б — пиковая концентрация тромбина, нМоль (Peak thrombin, Peakthr.); В — время достижения пиковой концентрации тромбина, мин., (Time to peak, †Peak); Г — эндогенный тромбиновый потенциал, нМоль/мин/, (ETP).

бином III и многократно ускоряет активацию протеина С. Таким образом, измерение ТГТ с ТМ позволяет оценить физиологическую работу антикоагулянтной системы протеина С.

Типичный вид кривой ГТ и измеряемые параметры ТГТ представлены на рис. 1.

На сегодняшний день существуют полностью автоматизированные анализаторы, использующие как флуориметрический, так и хромогенный методы измерения ГТ. Для определения эндогенного тромбинового потенциала в хромогенном методе используется кинетика конверсии медленно реагирующего синтетического тромбинового субстрата и определяется по высвобождению хромогена в образце обедненной тромбоцитами плазмы. Таким образом, современно развивающиеся технологии измерения генерации тромбина открывают возможность рутинно использовать этот тест в лабораториях [27].

Накоплен значительный опыт использования оценки генерации тромбина в клинической практике при разных состояниях. Увеличение генерации тромбина наблюдается при хронических заболеваниях легких [28], ожирении и диабете [29–31], ревматоидном артрите [32], курении, гипертензии [33]. Показано, что снижение веса приводит к снижению ГТ [34]. Также было установлено, что у пациентов с ОКС ГТ повышена в момент госпитализации и через шесть месяцев после выписки по сравнению

с группой контроля [35]. В другом исследовании было обнаружено, что концентрация аполипопротеина С-III, равная или более 10,5 мг, у пациентов с ИБС увеличивает риск смертности от сердечно-сосудистых событий в следующие пять лет после реваскуляризации миокарда. Такая концентрация положительно коррелирует с повышением ГТ [36].

В другом исследовании было показано, что у пациентов на фоне ОКС выявляется характерный протромботический профиль за счет повышения генерации тромбина, фактора VIII и снижения антиромбина III. Авторы считают, что изменения этих факторов определяют переход стабильной формы в нестабильную форму стенокардии [37]. Эти исследования подтверждают роль тромбинемии в развитии острых коронарных событий, а также неблагоприятных исходов реваскуляризации.

В результате проведенной ранее работы нами были обследованы в динамике 37 пациентов со стабильной ИБС, перенесших плановое чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ) в условиях кардиологического стационара СЗФМИЦ имени В. А. Алмазова [38].

В итоге наблюдения пациентов с ИБС после ЧКВ в динамике было выявлено достоверное повышение показателей ТГТ на 1–3 сутки реваскуляризации миокарда ($p < 0,05$). Такое состояние гиперкоагуляции, наблюдаемое в ранние сроки после оперативного вмешательства, возникает в результате воспаления и повреждения эндотелия. Эти патофизиологические процессы играют ключевую роль в образовании тромба внутри стента после ЧКВ и могут быть причиной ранних осложнений интраваскулярного вмешательства [10, 39–42].

Активация коагуляционного гемостаза на 1–3 сутки после ЧКВ, выяв-

ленная с помощью ТГТ, при нормальных результатах других тестов, в том числе АЧТВ, протромбинового индекса, D-димера, антиромбина III, говорит о том, что метод исследования генерации тромбина высокочувствителен в диагностике гиперкоагуляции. Однако мы не обнаружили значимых различий по показателям ТГТ между пациентами со стабильной ИБС и группой здоровых доноров, это обуславливает необходимость дальнейшего поиска методов диагностики нарушения системы гемостаза при атеросклерозе.

Список литературы

1. Watts V. L. and Motley E. D. Role of protease-activated receptor-1 in endothelial nitric oxide synthase-Thr495 phosphorylation. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 2009. 234 (2): p. 132–9.
2. Nysted S., Ramakrishnan V. and Sundelin J. The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1996. 271 (25): p. 14910–5.
3. Mactough S. C., et al. Diaryl ether inhibitors of farnesyl-protein transferase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001. 11 (10): p. 1257–60.
4. Eto M., et al. Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. *Circ. Res.*, 2001. 89 (7): p. 583–90.
5. Ming X. F., et al. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol. Cell Biol.*, 2002. 22 (24): p. 8467–77.
6. Ming X. F., et al. Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction. *Circulation*, 2004. 110 (24): p. 3708–14.
7. Delerive P., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ. Res.*, 1999. 85 (5): p. 394–402.
8. McNamara C. A., et al. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J. Clin. Invest.*, 1993. 91 (1): p. 94–8.
9. Schini-Kerth V. B., et al. Aggregating human platelets stimulate the expression of thrombin receptors in cultured vascular smooth muscle cells via the release of transforming growth factor-beta1 and platelet-derived growth factor AB. *Circulation*, 1997. 96 (11): p. 3888–96.
10. Borisoff J. I., et al. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc. Res.*, 2009. 82 (3): p. 392–403.
11. Szaba F. M. and Smiley S. T. Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood*, 2002. 99 (3): p. 1053–9.
12. Davies M. J., et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J. Pathol.*, 1993. 171 (3): p. 223–9.
13. Huber-Lang M., et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat. Med.*, 2006. 12 (6): p. 682–7.

14. Hatton M. W., Moar S. L. and Richardson M. Deendothelialization in vivo initiates a thrombogenic reaction at the rabbit aorta surface. Correlation of uptake of fibrinogen and antithrombin III with thrombin generation by the exposed subendothelium. *Am. J. Pathol.*, 1989. 135 (3): p. 499–508.
15. Merlini P. A., et al. Persistent activation of coagulation mechanism in unstable angina and myocardial infarction. *Circulation*, 1994. 90 (1): p. 61–8.
16. Borissoff J. I., et al. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. *Circulation*, 2010. 122 (8): p. 821–30.
17. Smith E. B., Fibrin deposition and fibrin degradation products in atherosclerotic plaques. *Thromb. Res.*, 1994. 75 (3): p. 329–35.
18. Bini A., et al. Identification and distribution of fibrinogen, fibrin, and fibrin(ogen) degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibodies. *Arteriosclerosis*, 1989. 9 (1): p. 109–21.
19. Bea F., et al. Melagatran reduces advanced atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006. 26 (12): p. 2787–92.
20. With Noto A. T., et al. Increased thrombin generation in persons with echogenic carotid plaques. *Thromb Haemost.*, 2008. 99 (3): p. 602–8.
21. Hemker H. C., Al Dieri R. and Beguin S. Thrombin generation assays: accruing clinical relevance. *Curr. Opin. Hematol.*, 2004. 11 (3): p. 170–5.
22. van Veen J. J., Gaff A. and Makris M., Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet? *Br. J. Haematol.*, 2008. 142 (6): p. 889–903.
23. Ю. А. Наместников, О. Г. Головина, О. Ю. Матвиенко, А. Е. Николаева, Е. А. Хаит, Л. П. Папаян, Условия постановки теста генерации тромбина для выявления состояний гиперкоагуляции. *Клиническая лабораторная диагностика*, 2011. 7.
24. Macfarlane R. G. and Biggs R. A thrombin generation test; the application in haemophilia and thrombocytopenia. *J. Clin. Pathol.*, 1953. 6 (1): p. 3–8.
25. Hemker H. C., et al. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb. Haemost.*, 2000. 83 (4): p. 589–91.
26. Hemker H. C., et al. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, 2002. 32 (5–6): p. 249–53.
27. О. Н. Соловьев, Т. И. Петренко, Глобальный тест оценки состояния системы гемостаза-эндогенный потенциал тромбина. *Медицинский алфавит. Современная лаборатория*, 2013. 4: p. 41–42.
28. Undas A., et al. Thrombin generation in chronic obstructive pulmonary disease: dependence on plasma factor composition. *Thromb. Res.*, 2011. 128 (4): p. e24–8.
29. Beijers H. J., et al. Body composition as determinant of thrombin generation in plasma: the Hoorn study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010. 30 (12): p. 2639–47.
30. Tripodi A., et al. Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *J. Thromb. Thrombolysis*, 2011. 31 (2): p. 165–72.
31. Fritsch P., et al. Haemostatic alterations in overweight children: associations between metabolic syndrome, thrombin generation, and fibrinogen levels. *Atherosclerosis*, 2010. 212 (2): p. 650–5.
32. Undas A., et al. Thrombin generation in rheumatoid arthritis: dependence on plasma factor composition. *Thromb Haemost.*, 2010. 104 (2): p. 224–30.
33. Rudez G., et al. Effects of ambient air pollution on hemostasis and inflammation. *Environ Health Perspect*, 2009. 117(6): p. 995–1001.
34. Ay L., et al. Thrombin generation in morbid obesity: significant reduction after weight loss. *J. Thromb Haemost.*, 2010. 8 (4): p. 759–65.
35. Skeppholm M., et al. Is fibrin formation and thrombin generation increased during and after an acute coronary syndrome? *Thromb Res.*, 2011. 128 (5): p. 483–9.
36. Olivieri O., et al. Apolipoprotein C-III predicts cardiovascular mortality in severe coronary artery disease and is associated with an enhanced plasma thrombin generation. *J. Thromb Haemost.*, 2010. 8 (3): p. 463–71.
37. Brummel-Ziedins K., et al. Thrombin generation in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease: dependence on plasma factor composition. *J. Thromb Haemost.*, 2008. 6 (1): p. 104–10.
38. Напалкова О. С., Эмануэль В. Л., Карпенко М. А., Березовская Г. А. Тест генерации тромбина в динамике у пациентов, перенесших чрескожное коронарное вмешательство. *Клиническая лабораторная диагностика*, 2015. 4: p. 40–45.
39. Gomes W. J. and Buffolo E. Coronary stenting and inflammation: implications for further surgical and medical treatment. *Ann. Thorac. Surg.*, 2006. 81 (5): p. 1918–25.
40. Gaspardone A. and Versaci F. Coronary stenting and inflammation. *Am. J. Cardiol.*, 2005. 96 (12A): p. 65L–70L.
41. Borissoff J. I., Spronk H. M. and ten Cate H., The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 2011. 364 (18): p. 1746–60.
42. Esmon C. T. The interactions between inflammation and coagulation. *Br. J. Haematol.*, 2005. 131 (4): p. 417–30.



Парма Диагностика Россия

- Высокая скорость поставки в любую точку России
- Уверенность в качестве исследований благодаря многоступенчатой системе контроля
- Современный уровень обслуживания и поддержки, предоставляемый клиенту на каждом этапе работы



РЕАКТИВЫ ДЛЯ БИОХИМИИ

энзимы
субстраты
электролиты
липиды

Санкт-Петербург, 194044
Б. Сампсониевский пр., 32
тел./факс: +7 (812) 324-27-78
тел./факс: +7 (812) 324-59-60
info@parma-d.ru

Москва, 129075
ул. Шереметьевская, 85, стр. 2
тел./факс: +7 (495) 787-44-01
moscow@westmedica.com

www.parma-d.ru
www.westmedica.com



Ю. И. Жиленкова



М. Н. Зенина



К. И. Пшеничная



Т. М. Ивашикина

Использование эритроцитарных индексов для скрининга бета-талассемии

Ю. И. Жиленкова, аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики¹

М. Н. Зенина, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики¹

А. В. Козлов, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики¹

С. С. Бессмельцев, д.м.н., проф., зам. директора по научной работе²

К. И. Пшеничная, д.м.н., проф. кафедры педиатрии, неонатологии и эндокринологии³

Т. М. Ивашикина, д.м.н., гл. врач КДЦД⁴

¹ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» (СЗГМУ) Минздрава России, г. Санкт-Петербург

²ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» (РосНИИГТ) ФМБА России, г. Санкт-Петербург

³ФП и ПП ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» (СПбГПМУ) Минздрава России, г. Санкт-Петербург

⁴СПб ГУЗ «Консультативно-диагностический центр для детей» (КДЦД), г. Санкт-Петербург

Use of red blood cell indices for screening β -thalassemia

Yu. I. Zhilenkova, M. N. Zenina, K. I. Pshenichnaya, T. M. Ivashikina, A. V. Kozlov, S. S. Bessmeltsev

The North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov; the Russian Scientific and Research Institute for Hematology and Transfusiology; the Saint-Petersburg State Pediatric Medical University; the Consultative and Diagnostic Center for Children, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

В статье обсуждаются вопросы раннего выявления состояний, обусловленных бета-талассемиями, на основании эритроцитарных параметров клинического анализа крови, и расчетных эритроцитарных индексов. Проанализированы их основные аналитические характеристики с использованием ROC-анализа, определены индексы, имеющие наибольшее диагностическое значение.

Ключевые слова: бета-талассемия, микроцитарная анемия, железодефицитная анемия, дифференциальный диагноз.

Summary

In the article the early detection of conditions associated with β -thalassemia, on the basis of parameters of erythrocyte blood count and index based on RBC parameters is discussed. We analyzed the basic analytical characteristics of the tests using ROC-analysis, which allowed to determine indexes that have the greatest diagnostic value.

Key words: β -thalassemia, microcytic anemia, iron deficiency anemia, differential diagnosis.

Термином «талассемия» обозначают группу заболеваний, характеризующихся нарушением синтеза α - или β -цепей молекулы гемоглобина [1].

Бета-талассемия является наиболее распространенным вариантом и встречается преимущественно в бассейне Средиземного моря, на Ближнем Востоке, в Закавказье, странах Юго-Восточной и Средней Азии [1]. Вследствие глобальных миграционных процессов и участвовавших межэтнических и межнациональных браков происходит

ассимиляция бета-глобиновых генов в популяциях, в которых она выявлялась спорадически [2, 3].

Выраженность клинических и лабораторных признаков зависит от генетического варианта талассемии. Особые трудности наблюдаются в диагностике форм, характеризующихся умеренной микроцитарной гипохромной анемией. Зачастую такие пациенты рассматриваются как пациенты с железодефицитной анемией (ЖДА) [4]. Им назначают препараты железа, в результате чего происходит его избыточное

накопление в организме. Помимо предотвращения осложнений, связанных с заболеванием и его лечением, выявление пациентов с малыми формами бета-талассемии является важной задачей с точки зрения профилактики рождения детей, гомозиготных по аномальному глобиновому гену [5].

Для подтверждения диагноза талассемии используют ряд лабораторных технологий: электрофорез, хроматография, масс-спектрометрия, молекулярно-биологические методы [6]. В то же время подходы к скри-

Таблица 1
Расчетные индексы, предлагаемые для скрининга микроцитарных гипохромных анемий, и их значения (по данным оригинальных публикаций)

Авторы	Индекс, формула	Отрезные значения	
		Железодефицитная анемия	Бета-талассемия
Ehsani M. A. [11]	$E = MCV - (10 \times RBC)$	> 15	< 15
England J. M. [12]	$E \& F = MCV - RBC - 5 \times Hb - 3,4$	> 0	< 0
Green R., King R. [13]	$G \& K = MCV^2 \times RDW / 100 \times Hb$	> 65	< 65
Mentzer W. [14]	$M = MCV / RBC$	> 13	< 13
Sirdah M. [15]	$Si = MCV - RBC - 3 \times Hb$	> 27	< 27
Srivastava P., Bevington J. [16]	$S = MCH / RBC$	> 3,8	< 3,8
RDWDI [9]	$RDWDI = MCV \times RDW / RBC$	> 220	< 220
RBC/Hb [9]	RBC/Hb	< 0,5	> 0,5

нингу пациентов в разных странах отличаются, и их эффективность продолжает обсуждаться [7].

Одним из подходов является использование расчетных индексов, основанных на использовании эритроцитарных параметров, включенных в стандартное меню большинства гематологических анализаторов (RBC, Hb, MCV, MCH, RDW) [8, 9].

Цель

Оценить возможность использования расчетных эритроцитарных индексов в качестве лабораторных маркеров для скрининга малой формы бета-талассемий.

Материалы и методы

В исследование были включены 80 пациентов различных возрастных групп, находившихся на обследовании и лечении в Консультативно-диагностическом центре для детей и Российском НИИ гематологии и трансфузиологии (г. Санкт-Петербург). Выделены две группы. Первую группу составили 40 пациентов (мужчин 19, женщин 21) с малой формой бета-талассемии в возрасте от 2 до 58 лет. Критериями включения в данную группу служили: наличие микроцитарной (MCV < 80 фл) гипохромной (MCH < 27 пг) анемии с типичными морфологическими изменениями эритроцитов (анизоцитоз, микроцитоз, пойкилоцитоз, мишеневидные формы, гипохромия эритроцитов), концентрацией железа в сыворотке крови (мужчины > 11,6 мкмоль/л, женщины > 9 мкмоль/л) и ферритина (мужчины > 15 мкг/л, женщины > 12 мкг/л). Диагноз гемоглобинопатии был подтвержден

с помощью определения фракций гемоглобина (Hb A₂ > 3% и [или] Hb F > 1%) [1, 6, 10].

Во вторую группу были включены 40 пациентов (мужчин 17, женщины 23) с железодефицитной анемией в возрасте от 2 до 54 лет. Критерием включения в данную группу являлось наличие доказанной микроцитарной (MCV < 80 фл) гипохромной (MCH < 27 пг) анемии, связанной с железодефицитом (концентрация железа в сыворотке крови у мужчин < 11,6 мкмоль/л, у женщин < 9 мкмоль/л; концентрация ферритина у мужчин < 15 мкг/л, у женщин < 12 мкг/л).

Материалом для исследования служила венозная кровь пациентов. Для гематологического исследования кровь собирали в пробирки с K₃ЭДТА в качестве антикоагулянта. Гематологические исследования были проведены с помощью автоматического гематологического анализатора Sysmex XT-4000i (Sysmex, Япония). Использовали следующие параметры: концентрация гемоглобина (Hb, г/л), количество эритроцитов (RBC, ×10¹²/л), средний объем эритроцита (MCV, фл), среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (MCH, пг), ширина распределения эритроцитов по объему (RDW,%).

Индексы рассчитывали по формулам, предложенным авторами, с использованием эритроцитарных параметров (табл. 1).

Для определения концентрации сывороточного железа и ферритина использовали пробирки с активатором свертывания для получения сыворотки (Vacuette, GreinerBio-One, Австрия). Концентрацию железа

и ферритина в сыворотке крови устанавливали с использованием анализатора Cobas 6000 и тест-систем производителя (Roche, Швейцария).

Определение фракций гемоглобина проводили методом капиллярного электрофореза (MINICAP, Sebia, Франция).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы STATISTICA 10 (StatSoft, Россия). Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Аналитические характеристики тестов были проанализированы с использованием ROC-анализа (программа MedCalc Software, Бельгия). Мы определяли отрезные значения (cutoff), при которых обнаруживаются максимальная чувствительность и специфичности теста. Определяли отношение правдоподобий LR (Likelihood Ratio) — показатель, объединяющий информацию чувствительности и специфичности, используемый для вычисления вероятности заболевания на основании положительного (LR[+]) и отрицательного (LR[-]) результатов теста.

Результаты

Результаты исследований пациентов представлены в табл. 2 и 3.

Как следует из представленных в табл. 2 данных, в основной группе количество эритроцитов было достоверно выше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$), тогда как значения параметров MCV и MCH были ниже ($p < 0,05$). Различия по показателям MCHC и RDW являлись недостоверными ($p > 0,05$). Концентрация же-

Таблица 2
Лабораторные данные пациентов основной группы и группы сравнения

Параметры	Основная группа, n=40	Группа сравнения, n=40	P
Hb, г/л	110±12	106±9	> 0,05
RBC, ×10 ¹² /л	5,7±0,6	4,7±0,5	< 0,05
MCV, фл	59,2±5,6	70,8±4,7	< 0,05
MCH, пг	19,4±1,9	22,9±2,4	< 0,05
MCHC, г/л	328±11	324±26	> 0,05
RDW,%	17,2±2,2	16,8±2,2	> 0,05
Железо, мкмоль/л	17,8±5,2	7,4±3,6	< 0,05
Ферритин, мкг/л	40,2±23,6	6,4±4,1	< 0,05

леза и ферритина в сыворотке крови в группе сравнения была достоверно ниже, чем в основной группе ($p < 0,05$).

Как следует из представленных в табл. 3 данных, чувствительность исследуемых параметров колеблется от 42,5 до 97,5 %, специфичность от 77,5 до 97,5 %. Наибольшей чувствительностью обладали MCV (97,5%), E (97,5%), Si (97,5%), а специфичностью — M (97,5 %), G&K (90%) и Si (87,5%). Значение LR(+) — способность положительных результатов этих тестов распознавать наличие заболевания для индекса M=34 расценивалась как отличная, для G&K=9 и для Si=7,8, как удовлетворительная. Величина отношения правдоподобия LR(-) позволила расположить исследуемые тесты по способности отрицательного результата предсказывать отсутствие заболевания. Поскольку значение LR(-) для Si и E=0,02 и MCV=0,03, их способность распознавать отсутствие заболевания признана отличной, RDWDI=0,08 — хорошей. Для G&K величина LR(-), равная 0,098, S=0,12,

MCH=0,13, M=0,15 позволила отнести этот тест к удовлетворительным. Показатель RBC/Hb, для которого LR(-) равен 0,45 и RDW%=0,72, обладали неудовлетворительной способностью распознавать отсутствие болезни.

Обсуждение

Для уточнения характера микроцитарной гипохромной анемии на этапе скрининга могут использоваться расчетные индексы, основанные на эритроцитарных параметрах автоматизированного анализа клеток крови [8, 9, 17, 18]. Их надежность оценивают по следующим параметрам:

1. чувствительности и специфичности;
2. способности распознавать заболевание на основании показателя «отношение правдоподобия» (+LR и -LR).

Для целей скрининга лучший индекс должен обладать максимальной чувствительностью для обнаружения наибольшего количества пациентов с малой формой бета-талассемии в обследуемой популяции. Чтобы избежать получения ложно-положительных ре-

зультатов и неоправданного проведения подтверждающих тестов, маркер должен обладать достаточной специфичностью. После отбора образцов на этапе скрининга в них определяют содержание Hb A2 и Hb F, что позволяет подтвердить либо опровергнуть диагноз «бета-талассемия» [1, 6, 10].

Из восьми апробированных нами индексов наиболее эффективными для целей скрининга оказались: M (Mentzer), G&K (Green and King) и Si (Sirdah), что в целом согласуется с недавно опубликованными данными [8, 9]. По результатам ROC-анализа из проанализированных нами эритроцитарных параметров (MCV, MCH и RDW) наилучшей чувствительностью и специфичностью обладает MCV (97,5 и 82,5 % соответственно). Индекс M (Mentzer) обладает максимальным значением специфичности (97,5 %) и отличной способностью распознавать заболевание (LR[+]=34) из всех рассмотренных тестов при достаточно невысоком уровне чувствительности (85 %). Поэтому оптимальным является использование его в паре с тестом, обладающим максимальной чувствительностью и удовлетворительной способностью распознавать отсутствие патологии (MCV и Si).

Выводы

1. Индексы M (Mentzer), G&K (Green and King) и Si (Sirdah) могут использоваться в качестве дополнительного лабораторного критерия для отбора образцов с целью дальнейшей диагностики талассемии

Таблица 3
Аналитические характеристики эритроцитарных параметров и индексов для дифференциальной диагностики бета-талассемий и ЖД

Индексы	Площадь под кривой (AUC)	Отрезные значения (cutoff)	Чувствительность, %	Специфичность, %	Отношение правдоподобий (LR)		P
					+LR	-LR	
MCV, фл	0,935	60,8	97,5	82,5	5,57	0,03	< 0,0001
MCH, пг	0,882	20,1	90,0	77,5	4,0	0,13	< 0,0001
RDW,%	0,566	15,8	42,5	80,0	2,13	0,72	0,3111
E	0,941	7,0	97,5	85,0	6,5	0,02	< 0,0001
E&F	0,940	-0,9	95,0	85,0	6,33	0,05	< 0,0001
G&K	0,942	62,4	90,0	90,0	9,0	0,11	< 0,0001
M	0,951	11,4	85,0	97,5	34,0	0,15	< 0,0001
Si	0,952	24,5	97,5	87,5	7,8	0,02	< 0,0001
S	0,911	3,7	90,0	82,5	5,14	0,12	< 0,0001
RDWDI	0,941	195	92,5	85,0	6,17	0,08	< 0,0001
RBC/Hb	0,760	0,49	62,5	82,5	3,57	0,45	< 0,0001

2. Достоинством расчетных эритроцитарных индексов является простота и доступность их получения и отсутствие дополнительных затрат, поскольку основой для расчета служат параметры, определяемые с помощью гематологического анализатора при выполнении рутинного анализа крови.
3. Расчет эритроцитарных индексов может использоваться на первом этапе выявления носительства талассемии при обследовании пациентов с микроцитарными гипохромными анемиями и служить основанием для проведения подтверждающих исследований.

Список литературы

1. Guidelines for the Clinical Management of Thalassemia. The thalassemia international federation.— 2008.— P. 114.
2. Лохматова М.Е. Оценка здоровья и качества жизни детей с наследственными гемолитическими анемиями: автореферат дисс... канд. мед. наук.— Москва, 2011.— С. 25.
3. Лохматова М.Е., Сметанина Н.С., Финогенова Н.А. Эпидемиология гемоглобинопатий в Москве. // Педиатрия.— 2009.— Том 87.— № 4.— С. 46–50.
4. Байтаева Д. А., Бессмельцев С. С. Диагностическая ценность определения основных показателей метаболизма железа при альфа-талассемии // Вестник Российской военной-медицинской академии.— 2012.— № 2.— С. 16–19.
5. Old J., Galanello R., Eleftheriou A. Prevention of Thalassaemias and other Haemoglobin Disorders. 2nd Edition.— 2013.— Vol. 1.— P. 212.
6. Abdullah Kutlar. Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. // XXXVIII. Ulusal Hematoloji Kongresi. Sickle Cell Center, Georgia Health Sciences University, USA.— 2012.— P. 107–111.
7. Бессмельцев С. С., Байтаева Д. А. Анализ применения современных методов исследования метаболизма железа в диагностике микроцитарной анемии у больных малой формой В-талассемии. // XIX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» Сборник материалов конгресса (тезисы докладов), Москва, 23–27 апреля 2012.— С. 39.
8. Urruchaga E., Borque L., Escanero J.F. The role of automated measurement of RBC subpopulations in differential diagnosis of microcytic anemia and β -thalassemia screening. // Hematopathology.— 2011.— V. 135.— P. 374–379.
9. Bencaliova G., Burkhardt T., Krafft A. Screening for β -thalassaemia trait in anaemic pregnant women. // Gynecol. Obstet. Invest.— 2006.— V. 62.— P. 20–27.
10. Bain B.J. Haemoglobinopathy diagnosis.— Blackwell Publishing, 2012.— P. 314.
11. Ehsani M. A., Shahghol E., Rahiminejad M. S. et al. A new index for discrimination between iron deficiency anemia and beta-thalassaemia minor: results in 284 patients. // Pak. J. Biol. Sci.— 2009.— V. 12.— P. 473–475.
12. England J. M., Bain B. J., Fraser P. M. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. // Lancet.— 1973.— 1:1514.
13. Green R., King R. A new red cell discriminant incorporating volume dispersion for differentiating iron deficiency anemia from thalassaemia minor. // Blood Cells.— 1989.— V. 5.— P. 481–495.
14. Mentzer W. C. Jr. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. // Lancet.— 1973.— 1:882.
15. Sirdah M., Tarazi I., Al Najjar E., et al. Evaluation of the diagnostic reliability of different RBC indices and formulas in the differentiation of the β -thalassaemia minor from iron deficiency in Palestinian population. // Int. J. Lab. Hematol.— 2008.— V. 30.— P. 324–330.
16. Srivastava P. C., Bevington J. M. Iron deficiency and/or thalassaemia trait. // Lancet.— 1973.— 1:832.
17. School M., School M. Application of innovative hemocytometric parameters and algorithms for improvement of microcytic anemia discrimination. // Hematology Reports.— 2015.— V. 7.— P. 52–55.
18. School M., School M., Linszen J. Efficacy of advanced discriminating algorithms for screening on iron-deficiency anemia and β -thalassaemia trait. // Hematopathology.— 2012.— V. 138.— P. 300–304.



На 76 году жизни скончался директор НПО «Ренам», доктор биологических наук, профессор Альберт Анатольевич Козлов

НПО «РЕНАМ» (научно-производственный отдел «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией») с глубоким прискорбием сообщает, что 16 августа 2015 года на 76 году скоропостижно скончался директор НПО «РЕНАМ», доктор биологических наук, академик РАЕН, профессор Козлов Альберт Анатольевич, и выражает глубокие соболезнования родным и близким.

А. А. Козлов родился в 1940 году, в 1966-м закончил Московский химико-технологический институт им. Д. М. Менделеева, и после обучения в аспирантуре в 1972-м успешно защитил кандидатскую диссертацию, а в 1999 году — докторскую диссертацию. Долгие годы А. А. Козлов являлся заведующим лабораторией комплексной переработки крови (ГНЦ РАМН). Под его руководством были разработаны новые технологии производства диагностических тест-систем для гемоглобинометрии и исследования системы гемостаза. Большая заслуга А. А. Козлова в создании полноценной отечественной научно-производственной базы для обеспечения медицинских учреждений реагентами и тест-системами для проведения необходимых гематологических анализов — НПО «РЕНАМ».

Альберт Анатольевич являлся авторитетным специалистом в сфере клинической лабораторной диагностики, членом экспертной комиссии по лабораторным реагентам комитета по новой медицинской технике Минздрава России. Его

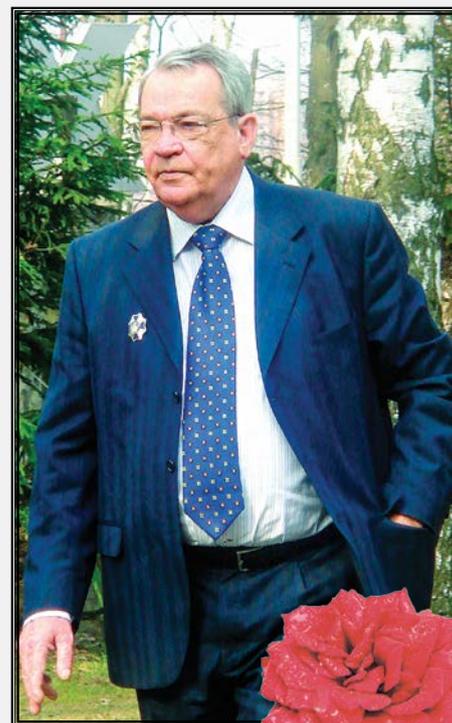
оригинальные работы были включены в программы многих отечественных и международных конгрессов. Он являлся автором девяти патентов и пяти авторских свидетельств, многих научных печатных работ, часть из которых являются монографиями, был руководителем, рецензентом и оппонентом ряда диссертационных работ. Под руководством Альберта Анатольевича активно проводились совместные научные исследования с ведущими научными и лечебными центрами — Кардиологическим научным центром, Научным центром сердечно-сосудистой хирургии им. Бакулева, НИИ неврологии, НИИ ревматологии, НИИ хирургии им. Вишневского и др.

Альберт Анатольевич был ученым высокого класса, прекрасным руководителем, умеющим воодушевлять людей новыми идеями. Нашему журналу Альберт Анатольевич также оказывал неоценимую поддержку с момента основания издания. Его статьи печатались с первых выпусков «Медицинского алфавита» с 2002 года.

Принципом идеологии и практической работы Альберта Анатольевича и сотрудников созданной им компании «РЕНАМ» был и остается следующий тезис: правильная диагностика — точный диагноз — адекватная терапия!

И этому принципу он незыблемо следовал всю сознательную жизнь!

Светлая память об Альберте Анатольевиче Козлове навсегда сохранится в сердцах всех знавших этого незаурядного человека!



DIALAB GmbH, Австрия

Гликозилированный гемоглобин HbA1c



Одно из лучших предложений на HbA1c

HbA1c (иммунотурбидиметрия) доступен для каждой лаборатории

Также в наличии:

Гомоцистеин (прямой ферментативный метод),
Цистатин С, для всех открытых систем
иммунотурбидиметрический метод

Биохимические реагенты Иммунотурбидиметрия

в том числе в системных упаковках (System Packs) для анализаторов Сапфир 400, KONELAB, ADVIA, Hitachi, Beckman (LX, CX, AU400/AU640)



Тест полоски для анализа мочи
на 1-11 параметров *

**Лучшая
цена**



Экспресс-тесты высокого качества на ВИЧ, Гепатит В, Гепатит С, Сифилис, Тропонин I, Кардио Комбо (TrI, Myo, СК-МВ) и др.



Анализаторы мочевых полосок
(120 и 500 тестов в час) *

STRIP ANALYSER 500
(500 полосок/час)

Акция



STRIP READER 40
(120 полосок/час)

Акция



* - до завершения регистрации не является изделием медицинского назначения

Продукция компании DIALAB GmbH, Австрия
Тел.: (812) 340-00-19, факс: (812) 340-00-31
e-mail: office@dialab-russia.ru

www.dialab-russia.ru

Нормоальбуминуриновая диабетическая нефропатия: патогенез, биомаркеры, интерпретация

В. В. Вельков

АО «ДИАКОН», г. Пущино, Московская область

Normoalbuminurinic diabetic nephropathy: pathogenesis, biomarkers, interpretations

V. V. Velkov, DIAKON Co., Pushchino, Russia



В. В. Вельков

Резюме

Краткий обзор, посвященный рассмотрению так называемого нормоальбуминуринового (или неальбуминуринового) пути развития диабетической нефропатии (ДН). Излагаются основные результаты исследований, проведенных в последние десятилетия, на основании которых установлено, что:

- развитие микроальбуминурии нельзя рассматривать как необходимую и необратимую стадию ДН, так как на практике часто происходят спонтанные ремиссии к нормоальбуминурии;
- несмотря на то, что наличие микроальбуминурии и скорость ее прогрессирования действительно связаны с развитием и прогрессированием ДН, отсутствие микроальбуминурии (то есть нормоальбуминурия) не обязательно означает, что у пациента отсутствует прогрессирующее падение гломерулярной и тубулярной функции;
- микроальбуминурия, как таковая, не имеет чувствительности и специфичности, достаточной для диагностики ДН и для прогнозирования ее исходов.

Полагается, что нормоальбуминуриновый путь ДН может быть связан:

- с преобладающими макрососудистыми повреждениями (макроангиопатией) и (или);
- с повторными или с предшествовавшими ненормализованными эпизодами острого повреждения почек (ОПП), пусть даже и имевшими относительно мягкую тяжесть;
- с тубулоинтерстициальными повреждениями;

Альбуминуриновый путь ДН может быть связан:

- с классической манифестацией диабетической микроангиопатии и
- с типичными гломерулярными повреждениями.

Особо рассматриваются методы диагностики нормоальбуминуриновой и протеинуриновой ДН с помощью биомаркеров цистатина С и NGAL, оценивающих гломерулярную и тубулярную функции, а также диагностические характеристики преclinical болезни почек и субclinical острого повреждения почек.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, диабетическая нефропатия, микроальбуминурия, нормоальбуминурия, цистатин С, NGAL

Summary

The brief review of studies dedicated to so called normoalbuminurinic (or nonalbuminurinic) pathway of diabetic nephropathy (DN) development. The results of such studies carried out during the last decades demonstrated that: 1) the development of microalbuminuria can no longer be viewed as a committed and irreversible stage of DN, as spontaneous remission is now reported as a common occurrence; 2) although both the absolute level and rate of change of microalbuminuria are linked to the development and progression of DN the absence of microalbuminuria or its progression to proteinuria does not signify that an individual patient is safe from a progressive decline in glomerular function; 3) microalbuminuria on its own lacks the necessary sensitivity or specificity to accurately predict kidney outcomes for patients with diabetes.

It is believed that: 1) nonalbuminurinic pathway might be related to macroangiopathy and/or be the consequence of repeated and/or unresolved episodes of acute kidney injury, even of mild degree and might be related with tubulointerstitial lesions; 2) albuminurinic pathway would be a classical manifestation of diabetic microangiopathy and would be associated with typical glomerular lesions.

The methods of diagnostics of normoalbuminurinic and proteinurinic DN with the usage of biomarkers Cystatin C and NGAL evaluating glomerular and tubular functions and diagnostics characteristics of preclinical kidney disease and subclinical acute kidney injury are specially reviewed.

Key words: chronic kidney disease; diabetic nephropathy; microalbuminuria, normoalbuminuria, cystatin C, NGAL.

Наверяд ли специалиста нужно убеждать в том, насколько важна ранняя диагностика диабетической нефропатии (ДН). Действительно, ДН — это путь, который не только ведет к терминальным стадиям ренальных заболеваний (ТСРЗ) но и к тяжелым сердечно-сосудистым осложнениям, серьезность которых такова, что на ранних стадиях ДН вероятность умереть от острых коронарных событий в 5–10 раз выше, чем вероятность дожить до терминальных стадий ренальных заболеваний (ТСРЗ) [1]. Каковы же самые первые признаки

развития ДН? Ранние исследования показали, что у большинства пациентов с сахарным диабетом первого типа (СД1) в течение 6–14 лет сначала возникает микроальбуминурия, которая затем переходит в макроальбуминурию. Дальнейшие исследования привели к концепции, согласно которой развитие ДН проходит пять стадий [2].

1. Гиперфилтрация: повышение скорости клубочковой фильтрации (СКФ), связанное с нефромегалией и, возможно, с транзиторным повышением скорости экскреции альбумина (СЭА).

2. Молчащая (silent) ДН: СКФ и СЭА возвращаются к норме, при этом довольно часто имеют место нормоальбуминурия, транзиторные эпизоды микроальбуминурии; большинство (примерно две трети) пациентов с СД в течение жизни остаются на этой стадии.
3. Начальная (incipient) ДН: примерно треть пациентов прогрессируют в третью стадию, которая характеризуется персистирующей микроальбуминурией.
4. Явная (overt) ДН: микроальбуминурия прогрессирует в макроаль-

буминурию, развивается гипертензия, начинает снижаться СКФкр (рассчитываемая по сывороточному креатинину).

5. ТСРЗ, снижение СКФ приводит к необходимости пожизненной ренальной заместительной терапии. Утяжеление альбуминурии идет параллельно с прогрессированием ретинопатии [2].

Однако в конце девяностых и в начале нулевых стали накапливаться факты, не согласующиеся с такой картиной прогрессирования ДН. И количество таких фактов все нарастало. Так, в результате длительного исследования (4 706 лиц наблюдались в течение 18 лет) выявилось, что только у 29% пациентов с установленным СД1 развивалась микроальбуминурия, и только треть из них прогрессировала до персистирующей макроальбуминурии, а другая треть спонтанно возвращалась к нормоальбуминурии [3].

А среди 1 171 пациента с СД2, как это было показано в другом наблюдении, только 13% имели серьезно сниженную СКФ (< 60 мл/мин./1,73 м²), а у 30% не было ни альбуминурии, ни ретинопатии [4].

В другом, более позднем исследовании (1 439 пациентов с СД2, наблюдение 19 лет) было установлено, что: 1) спонтанная ремиссия к нормоальбуминурии происходит у 40% больных, 2) у 30% пациентов с СД2 и с ДН снижение СКФ происходит при нормоальбуминурии [5].

В целом результаты исследований, проведенных за последние десятилетия, привели к серьезному пересмотру механизмов развития ДН [6]. Причиной такого пересмотра являются изменения картины типичного течения ДН, происходящие в результате терапии СД. На фоне такой терапии картина развития ДН (по крайней мере в индустриальных странах, где проводились исследования) сильно изменилась и привела к отказу от представлений о том, что: 1) микроальбуминурия неизбежно ведет к макроальбуминурии и 2) падение СКФ начинается только после макроальбуминурии. В настоящее время из-за терапии СД ремиссия (или регрессия) ми-

кроальбуминурии является общей закономерностью течения ДН при СД обоих типов, при этом частота такой ремиссии значительно перевешивает случаи прогрессирования к протеинурии, и, более того, снижение СКФ часто может происходить до альбуминурии и даже независимо от нее [6].

Возникает вопрос, если это все правда, можно ли тогда считать альбуминурию и СКФ (согласно креатинину) надежными маркерами для диагностики и мониторинга ДН? Или нужны новые биомаркеры?

Цистатин С — маркер гломерулярной и тубулярной функции

Это маленький белок с молекулярной массой 13 kDa, входящий в семейство ингибиторов цистеиновых протеиназ. Он необходим для регуляции нормальных физиологических процессов путем ингибирования активностей протеиназ, которые и являются мишенями его действия. Исследования показали, что цистатин С: 1) с постоянной скоростью синтезируется всеми клетками, содержащими ядра, и поступает в кровь, 2) полностью (100%) фильтруется в клубочках, 3) полностью (100%) метаболизируется в проксимальных канальцах и ими не секретировается [обзоры 7–10].

Цистатин С в сыворотке — маркер гломерулярной функции

Сывороточные уровни s-цистатина С (s — serum, сыворотка) обусловлены:

1. постоянной скоростью его синтеза, практически не зависящей от возраста, пола, веса;
2. постоянной скоростью его выведения из организма, которая зависит преимущественно от ренальных функций;

Чем тяжелее ренальная патология, тем хуже цистатин С фильтруется в почках и тем выше его уровень в крови. Однократное измерение уровня цистатина С в крови позволяет с помощью специальных формул рассчитывать значения СКФ [7–10].

Многочисленные исследования показали, что цистатин С — более чувствительный маркер ренальной функции, чем креатинин, особенно в случаях умеренного снижения СКФ, происходящего в так называемой «слепой зоне креатинина» (creatinine blind area) при снижении СКФ от 90 до 60 мл/мин./1,73 м². В этом диапазоне пропорциональности между уровнями креатинина и истинными значениями СКФ, измеряемыми по экзогенному маркеру, нет. Мета-анализ показал, что цистатин С дает более точное приближение к реальным значениям СКФ, чем креатинин. Так, коэффициент корреляции концентрации цистатина С с СКФ (по экзогенному маркеру) составлял 0,92 против 0,74 для креатинина. Значения AUC ROC для цистатина С составляли 0,93 против 0,84 для креатинина [11].

Принципиально важно, что однократное измерение s-цистатина С позволяет рассчитывать СКФ согласно специальным разработанным формулам, наиболее применяемой из которых является формула Хоука (Hoek):

$$\text{СКФ (мл/мин./1,73 м}^2\text{)} = 80,35 / \text{цистатин С (мг/л)} - 4,32 \text{ [12].}$$

В целом как маркер СКФ s-цистатин С значительно превосходит s-креатинин и клиренс креатинина, так как способен:

- диагностировать самые ранние изменения СКФ (гиперфильтрацию при гипертензии и диабетической нефропатии и ранние стадии гипофильтрации);
- отслеживать быстрые изменения СКФ при развитии ОПП;
- точно оценивать ренальные функции у педиатрических и гериатрических пациентов;
- прогнозировать сердечно-сосудистые и другие осложнения функции почек [7–10].

Референтные уровни цистатина С в сыворотке (мг/л): мужчины — 0,50–0,96; женщины — 0,57–0,96; дети младше одного месяца — 1,37–1,89; 1–12 месяцев — 0,73–1,17; старше года — 0,51–0,95 [7–10].

Цистатин С в моче — маркер тубулярной дисфункции

Ранее полагалось, что в значимых количествах u-цистатин С (u-urinary) в моче обнаруживаться не должен. В дальнейшем было установлено, что при нарушении тубулярной функции концентрации u-цистатина С могут возрастать до 200 раз, особенно при развитии острого повреждения почек (ОПП) [7–10].

В целом согласно многочисленным исследованиям: 1) повышенный уровень u-цистатина С — маркер нарушения эффективности реабсорбции в проксимальных канальцах; 2) верхний референсный предел для u-цистатина С не зависит от пола, возраста.

Референсные уровни цистатина С в моче (мг/л): в норме — $0,096 \pm 0,044$; при тубулярных заболеваниях — $4,31 \pm 3,85$; при гломерулярных заболеваниях — $0,106 \pm 0,133$ [7–10].

NGAL — ранний маркер острого повреждения почек

NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) — липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, или липокалин 2. При различных острых патологических состояниях синтезируется в разных органах и выходит в кровоток. Функции NGAL: 1) стимулирование пролиферации поврежденных клеток, в особенности эпителиальных и 2) противодействие бактериальным инфекциям (является бактериостатиком). В норме NGAL стимулирует дифференцировку и структурную реорганизацию ренальных эпителиальных клеток. При развитии ренальных заболеваний уровни NGAL в сыворотке постепенно возрастают и коррелируют с тяжестью патологии [13–15]. При развитии ОПП: 1) повышается синтез NGAL в печени, легких, нейтрофилах, макрофагах и других клетках иммунной системы; 2) в сыворотке повышаются уровни s-NGAL; 3) повышенные уровни s-NGAL поступают в почки и реабсорбируются в проксимальных канальцах. Функция s-NGAL, поступившего в почки, — это ограничение и (или) уменьшение тяжести повреждений в проксимальных канальцах.

Параллельно в дистальных частях нефрона в течение нескольких часов после их повреждения происходит локальный массовый синтез NGAL de novo и выход его в мочу. Функции NGAL в моче (u-NGAL), синтезированного в почках при ОПП: 1) стимулирование выживания и пролиферации клеток в дистальном сегменте, обычно подвергающихся апоптозу при ОПП; 2) антиинфекционное бактериостатическое действие на дистальный уrogenитальный тракт [13–15].

В целом s-NGAL и u-NGAL — ранние маркеры развития ОПП разной этиологии. Четко и многократно показано, что при повреждении ренальных канальцев происходит повышение уровня s-NGAL в 7–16 раз, а u-NGAL в 25–1 000 раз! Комплексное измерение s-NGAL и u-NGAL дает весьма ценную, специфичную и, самое главное, своевременную прогностическую информацию о развитии ОПП [13–15].

Так какой же вклад в развитие новых представлений о ДН внесли эти новые маркеры?

u-Цистатин С — лучший эндогенный маркер СКФ, особенно при ДН

Действительно, при гипергликемии расчет СКФ_{цис} (согласно уровням s-цистатина С) является более точным, чем по креатинину (СКФ_{кр}). Так, при наблюдении пациентов с СД2 их распределили по группам согласно терциям HbA_{1c}: 1) $\leq 9,0\%$; 2) $9,1–10,8\%$; 3) $>10,8\%$. У пациентов всех трех групп сравнивались значения СКФ (мл/мин./1,73м²), определенные согласно: 1) уровням экзогенного изотопного маркера, 2) по формулам СКФ_{кр} (Cockcroft-Gault и MDRD) и 3) по СКФ_{цис}. У всех пациентов СКФ_{изотоп} составляла $93,1 \pm 34,1$ мл/мин./1,73м², СКФ_{цис} — $83,5 \pm 33,2$; СКФ MDRD — $74,8 \pm 31,3$; по Cockcroft-Gault — $68,8 \pm 38,6$; Таким образом, наиболее точным было определение СКФ_{цис}, особенно при HbA_{1c} выше 10,8%, при этом уровне гипергликемии значения СКФ_{изотоп} и СКФ_{цис} полностью совпадали [16]. Для оценки ренальной функции у пациентов с СД2 и с избыточным весом наиболее точным является расчет СКФ по простой формуле (100/сывороточный цистатин С) [17, 18].

Повышение s-цистатина С связано с утяжелением инсулинорезистентности, развитием метаболического синдрома и СД и с последующим ухудшением ренальной функции

Как показывают недавние исследования — повышение s-цистатина С, начиная от нормы и до пограничного уровня, связано с повышением степени инсулинорезистентности (ИР) и рисков неблагоприятных исходов. Более того, как оказалось (при наблюдении 1 502 лиц в течение 16 лет), повышение s-цистатина С предсказывает развитие метаболического синдрома (МС) и увеличение количества его факторов. Так, при s-цистатине С во второй, третьей и четвертой квартили риски развития МС составляли: 1,00 (0,71–1,40); 1,48 (1,06–2,07) и 1,91 (1,37–2,68) соответственно [19]. Существенно, что при повышении s-цистатина количество факторов МС у пациентов повышается линейно [20].

Аналогичная картина наблюдается и при СД. При наблюдении пациентов с СД1, находившихся на интенсивной инсулиновой терапии и имевших пониженную скорость утилизации глюкозы, (согласно которой и оценивали степень ИР), оказалось, что уровни s-цистатина С (мг/л) при пониженной скорости утилизации глюкозы составляли 0,59 против 0,46 у пациентов с нормальной утилизацией глюкозы [21]. В другом исследовании у 478 пациентов с СД2 измерялись степень ИР с помощью определения индекса НОМА-IR, а также гомоцистеин, липопротеин (а), высокочувствительный С-реактивный белок, фибриноген, отношение альбумин/креатинин (ОАК) и СКФ_{кр}. После поправок на возраст, пол, индекс массы тела (ИМТ) и СКФ_{кр} было установлено, что повышение НОМА-IR-индекса связано с повышенными уровнями s-цистатина С, составлявшими (мг/л, квартили): $1,16 \pm 0,15$; $1,40 \pm 0,13$; $1,49 \pm 0,13$ и $2,00 \pm 0,17$. При этом повышение s-цистатина С было пропорциональным количеству факторов МС у данного пациента и составляло: 1) при наличии одного фактора МС — $1,08 \pm 0,06$; 2) двух факторов — $1,19 \pm 0,04$; 3) трех факторов — $1,20 \pm 0,04$; 4) четырех факторов — $1,23 \pm 0,04$ и 5) пяти факторов МС — $1,37 \pm 0,05$. Также была показана положительная корреляция

между цистатином С, гомоцистеином, липопротеином (а), высокочувствительным С-реактивным белком, фибриногеном, ОАК и отрицательная корреляция с СКФкр [22].

Крайне существенно, что по мере повышения s-цистатина С, ИР и утяжеления МС падает гломерулярная функция. Более того, согласно текущим представлениям, развитие МС и ХБП является дорогой с двусторонним движением. Развитие МС довольно часто приводит к ХБП, а у пациентов с исходно диагностированными ХБП весьма часто в последствии выявляется МС. Так, при анализе базы данных о 7800 лицах, имевших нормальную ренальную функцию и наблюдавшихся 21 год, выявилось, что наличие МС связано с риском развития хронической болезни почек (ХБП), составляющим 2,6 (1,68–4,03) [23]. С другой стороны, недавний мета-анализ 11 исследований, включавших наблюдение 30 146 лиц, установил, что при наличии третьей стадии ХБП (СКФкр ниже 60 мл/мин./1,73 м²) риск развития МС составляет 1,55 (1,34–1,80). Возможные механизмы развития ХБП при МС, как полагаются, включают: ИР, оксидативный стресс, повышение уровней провоспалительных цитокинов, повышенную продукцию профибротических факторов, избыточный рост соединительной ткани, повышение тяжести микроваскулярных повреждений, ренальную ишемию [24].

s-Цистатин С — предиктор неблагоприятных исходов при ХБП

Показательны результаты масштабного многоцентрового наблюдения, длившегося 4,7 года и включавшего 11 901 пациентов, входивших в исследования Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) и Cardiovascular Health Study (CHS). Все пациенты были распределены на группы с СКФкр ниже 60 мл/мин./1,73 м² и СКФцис ниже 60 мл/мин./1,73 м². Данные значения СКФкр и СКФцис считались диагностическим для ХБП.

В итоге в когорте MESA диагноз «ХБП» имели: согласно СКФкр — 9% индивидов; согласно СКФцис — 2%; согласно СКФкр+цис — 4%; а в ко-

горте CHS: согласно СКФкр — 12%; согласно СКФцис — 4% и согласно СКФкр+цис — 13%.

Риски смертности у лиц без исходных ХБП составляли:

- в когорте MESA: согласно СКФкр — 0,8 (0,5–1,26); согласно СКФцис — 3,23 (1,84–5,67), согласно СКФкр+цис — 1,93 (1,27–2,92);
- в когорте CHS: согласно СКФкр — 1,09 (0,98–1,21), согласно СКФцис — 1,78 (1,53–2,08) и согласно СКФкр+цис — 1,74 (1,58–1,93) соответственно.

Сходные закономерности наблюдались для рисков ССЗ, сердечной недостаточности и неблагоприятных исходов при ренальной недостаточности. Полагается, что у пациентов с установленными ХБП s-цистатин С выявляет лиц с наивысшими значениями рисков сердечно-сосудистых и ренальных осложнений [25].

s-цистатин С также является предиктором микрососудистых осложнений СД.

Чем выше s-цистатин С, тем выше риск тяжелой диабетической ретинопатии

Весьма показательно наблюдение 544 пациентов с СД2 (средняя длительность СД2 8,75 ± 6,43 года). Все пациенты были разделены на группы согласно квартилям цистатина С в диапазоне 0,8–1,3 мг/л. Оказалось, что у 52,8% пациентов диабетической ретинопатии (ДРТ) выявлено не было; у 31,76% была диагностирована ДРТ без снижения остроты зрения (ДРТ без СОЗ), но с наличием мягкой и умеренной непролиферативной РТ; у 15,41% пациентов была диагностирована ДРТ со снижением остроты зрения (ДРТ с СОЗ), включая наличие тяжелой непролиферативной или пролиферативной ретинопатии. Оптимальный пограничный уровень цистатина С (мг/л) для выявления ДРТ с СОЗ составил 1,25 (специфичность 87,6%). Следовательно, что у пациентов с s-цистатином С в верхней квартили (≥ 1,3 мг/л) по сравнению с уровнем в нижней (квартили ≥ 0,8 мг/л) риск тяжелой ДРТ был повышен в 11 (!) раз, а риск смертности в 18 (!) раз. Полагается, что «цистатин С это эффективный и недорогой сывороточный показа-

тель, с помощью которого следует проводить скрининг пациентов с возможной ретинопатией со снижением остроты зрения и предотвращать развитие слепоты в диабетической популяции» [26].

Чем выше s-цистатин С, тем выше риск диабетической периферической нейропатии

При наблюдении 937 пациентов с СД2 оказалось, что у лиц с диабетической периферической нейропатией (ДПН) средние уровни s-цистатина С (мг/л) составляли: 1,3 (1,1–1,5) против 1,0 (0,9–1,3) у лиц без ДПН. Риски развития ДПН составляли: при s-цистатине С в первой квартили — 1,0, во второй — 1,753 (1,055–2,9121), в третьей — 2,463 (1,445–4,917), в четвертой — 5,867 (2,075–16,589). Оптимальный пограничный уровень s-цистатина С для выявления ДПН у мужчин составлял 1,25 мг/л и 1,05 мг/л у женщин. Полагается что «цистатин С может быть потенциальным биомаркером ДПН при СД2» [27].

Итак, s-цистатин — это индикатор гломерулярной дисфункции, ранний маркер развития нормоальбуминуриной ДН и предиктор ее макрососудистых и микрососудистых неблагоприятных исходов. Однако как показывают многочисленные исследования, при развитии ХБП, в особенности нормоальбуминуриной ХБП, сначала происходит повреждение канальцев и только потом клубочков [28].

Какую роль именно тубулярные нарушения играют в развитии ДН? Как они связаны с гломерулярными? Следует ли их диагностировать?

u-Цистатин С выявляет ранние тубулярные повреждения

Действительно, при наблюдении 343 пациентов с ожирением и МС оказалось, что значения отношения u-цистатин С / u-креатинин у лиц с МС были весьма повышены и составляли (мг/г кр): 0,82 ± 0,07 против 0,61 ± 0,02 у лиц без МС; при этом уровни s-цистатина С составляли (мг/л): 0,86 ± 0,02 против 0,78 ± 0,03 соответственно. Доля выявленных ХБП при МС составляла 19,5% против 5,4% у лиц без МС; значения СКФкр при МС составляли

81,7 ± 1,7 мл/мин. против 85,4 ± 2,2 без МС; уровни HbA1c при МС составляли 6,98 ± 0,1 % против 5,99 ± 0,1 без МС. Полагается, что чем больше у пациента компонентов МС, тем выше значения отношения $\text{u-цистатин С} / \text{u-креатинин}$ и тем тяжелее тубулярные повреждения [29].

В специальном исследовании наблюдались пациенты с СД2 (n = 332), среди которых были пациенты с нормоальбуминурией (n = 210), с микроальбуминурией (n = 83) и с макроальбуминурией (n = 42). Показано, что у пациентов с СД2 уровни u-цистатина С и s-цистатина С могут быть маркерами ренальной дисфункции уже при нормоальбуминурии. При развитии ДН уровни u-цистатина С и s-цистатина С повышались и достигали высоких значений уже до микроальбуминурии. Авторы полагают, что «измерение уровней u-цистатина С в сыворотке и моче — это полезный, практичный и неинвазивный метод для выявления ренальных нарушений при СД2, особенно у пациентов с нормоальбуминурией» [30].

Насколько динамика u-цистатина отражает прогрессирование тубулярной дисфункции при СД2 с ДН? В исследование входили 237 пациентов с СД2, наблюдение длилось 29 (13–44) месяцев. Измеряли соотношение $\text{u-цистатин С} / \text{u-креатинин}$ ($\text{u-цис} / \text{u-кр}$). Показано, что повышенные значения $\text{u-цис} / \text{u-кр}$ достоверно связано с падением СКФкр (MDRD), при этом также и в группе пациентов с СКФкр ≥ 60 мл/мин./1,73м². Наиболее высокими уровни $\text{u-цис} / \text{u-кр}$ (верхняя терциль) были у пациентов с быстрым падением СКФкр до значений, характерных для ХБП третьей стадии. Риск прогрессирования к ХБП третьей стадии при u-цистатине С в верхней терцили составлял 7,26. В целом, как полагают авторы, «при ДН u-цистатин С — это предиктор прогрессирования нарушения тубулярной функции, независимый от уровней s-цистатина С , характеризующих гломерулярную дисфункцию» [31].

Гиперфилтрация при СД

Действительно, на ранних стадиях СД1 происходит развитие ренальной гипертрофии и, как результат, гипер-

филтрации. Так, при наблюдении (в течение 9,5 ± 4,4 лет) пациентов с СД1 и с исходными нормальными ренальными функциями было показано, в частности, что увеличенный исходный объем почек (312,8 ± 52,6 против 281,4 ± 46,1 против 236,8 ± 41,6 мл/мин./1,73м²) был повышен у пациентов, предрасположенных к микроальбуминурии и к последующему более быстрому падению СКФ. Полагается, что развитие гипертрофии почек предшествует гиперфилтрации [32]. В более позднем исследовании при наблюдении (в течение 3,1 года) пациентов с гипертензией и СД1 оказалось, что у исходно нормоальбуминуриных лиц с гиперфилтрацией (СКФцис выше 115 мл/мин./1,73м²) микроальбуминурия развивалась чаще, чем при исходной нормофилтрации. Авторы полагают, что «для предсказания развития микроальбуминурии на ранних стадиях гипертензии гиперфилтрация, рассчитываемая согласно СКФцис, является более чувствительным индикатором, чем клиренс креатинина» [33].

В целом чем выше гиперфилтрация, тем тяжелее будущее течение ДН. Через несколько лет после начала гиперфилтрации ренальная функция еще больше ухудшается, что манифестируется как «нормофилтрация», хотя, разумеется, о реальном возвращении функции почек к норме и речи быть не может. Далее начинается гипофилтрация [34].

s-Цистатин С диагностирует гиперфилтрацию и ранее развитие гипофилтрации

Гиперфилтрация, как уже говорилось, является ранним признаком ДН. Наличие гиперфилтрации приводит к более быстрому ухудшению ренальных функций, чем при исходной нормофилтрации. Патологический «тубулоцентрический» механизм гиперфилтрации, как полагается, связан с нарушением тубуло-гломерулярной обратной связи, вызываемой повышением реабсорбции в проксимальных канальцах [34–36].

В большинстве исследований значениями гиперфилтрации считают те, которые находятся в диапазоне от 125 до 145 мл/мин./1,73м² [34–36].

Скорость падения СКФцис в диапазоне «нормофилтрации» (90–60 мл/мин./1,73м²) — индикатор развития ХБП

В специальном исследовании у 30 пациентов с СД2 в течение четырех лет определяли СКФ с помощью иоталамата и s-цистатина С . При серийных определениях СКФ (каждые шесть месяцев) было обнаружено, что предиктором падения СКФ является не только высокий исходный уровень гиперфилтрации, но и значения дельты СКФ в интервале от ~ 150 мл/мин./1,73м² (гиперфилтрация) до 80 мл/мин./1,73м² (нормофилтрация), определяемые с помощью экзогенного маркера и s-цистатина С , но не креатинина. Определение СКФкр (MDRD) не выявляло ни гиперфилтрации, ни снижения СКФ в зоне нормофилтрации. Авторы полагают, что «при СД2 серийные измерения СКФцис точно выявляют тенденцию падения ренальной функции у лиц с исходно нормальной или повышенной СКФ» [37].

СКФцис выявляет нормоальбуминурических пациентов с риском развития ДН

В относительно раннем исследовании пациентов с СД1 и с исходными нормоальбуминурией или микроальбуминурией было обнаружено, что снижение ренальной функции, оцениваемое как падение СКФцис > 3,3 % в год имело место у 9 % лиц с нормоальбуминурией и у 31 % лиц с микроальбуминурией [38]. Затем при наблюдении в течение 4–8 лет пациентов с СД1 и с исходными нормоальбуминурией или микроальбуминурией серийные измерения s-креатинина и s-цистатина С (проводимые каждые шесть месяцев) и расчет значений СКФкр-цис показали, что прогрессирующее падение СКФ (по крайней мере на 3,3 % в год) имело место у 10 % пациентов с нормоальбуминурией и у 32 % с микроальбуминурией. Существенно, что исходные уровни креатинина с риском падения СКФ связаны не были. Авторы заключили, что «снижение ренальных функций при СД1 начинается при нормоальбуминурии. Изменение скорости

эксекреции альбумина (СЭА), появление микроальбуминурии и ее прогрессирование к макроальбуминурии происходят *параллельно* с ранним снижением ренальной функции» [39].

В другом недавнем исследовании при наблюдении детей (средний возраст 13,1 лет) с СД1 показано, что повышение s-цистатина С связано со снижением ренальной функции, и, что важно, при этом уровни s-цистатина С не имели корреляции с микроальбуминурией. Авторы полагают, что «s-цистатин С может быть дополнительным тестом, назначаемым для выявления ранних стадий ДН при нормоальбуминурии» [40].

Что касается СД2, то еще в 1992 и 1994 годах было установлено, что у 20–30% пациентов ренальная недостаточность наблюдается уже при нормоальбуминурии [41, 42]. Более того, в последующих исследованиях было показано, что при СД2 количество случаев неальбуминуриного ренального повреждения обычно составляет около 40% [43, 44], но может достигать и 70% [45]. Весьма показательным является пятнадцатилетнее наблюдение 1 132 пациентов с СД2, исходно имевших нормальный креатинин и не имевших альбуминурии. Показано, что ДН развилась у 67,1% больных, при этом в течение всего периода наблюдения у 50,8% пациентов была нормоальбуминурия, а микроальбуминурия развилась только у 16% больных [46].

В недавнем исследовании в течение двух лет наблюдали 79 госпитализированных пациентов с СД2, имевших тяжелую ренальную дисфункцию (СКФкр ниже 30 мл/мин./1,73м²). Как оказалось, 21,8% пациентов имели нормоальбуминурию, 20,5% — микроальбуминурию и 57,7% — макроальбуминурию. Нормоальбуминуриновые пациенты были преимущественно женщинами с низким статусом курения, с более высокими показателями ИМТ, более высокими общим холестерином и Х-ЛПНП, более низкими значениями HbA1c и сывороточного креатинина. Авторы сделали вывод, что «около 20% пациентов преимущественно женского пола с тяжелым ренальным заболеванием, связанным с СД2, имеют нормальную экскрецию альбумина в мочу» [47].

Аналогичные результаты были получены при наблюдении в течение четырех лет пациентов с СД2, когда сравнивались результаты расчета СКФ по s-цистатину С и по измерению иоталамата. Снижение ренальной функции определялось как падение СКФиоталамат $\geq 3,3\%$ в год. Затем пациентов наблюдали еще 17,8 лет до появления ТСРЗ и летальных исходов. В первой фазе исследования выяснилось, что снижение ренальной функции имело место: 1) у 32% лиц с исходной нормоальбуминурией, 2) у 42% лиц с исходной микроальбуминурией и 3) у 74% лиц с исходной макроальбуминурией. У 41% всех лиц со сниженной ренальной функцией в течение 10 лет наблюдалось развитие ТСРЗ и, что существенно, развитие ТСРЗ также имело место у 15% лиц без предшествовавшего снижения ренальных функций. Что принципиально, при СД2 падение СКФ часто происходило до развития макроальбуминурии, а прогрессирование к ТСРЗ сильно зависело от утяжеления макроальбуминурии [48].

В недавно опубликованных результатах наблюдения 742 амбулаторных больных СД2 все пациенты были разделены на четыре группы согласно значениям СКФкр (мл/мин./1,73м²): группа А — СКФкр ≥ 80 ; группа Б — 5 080; группа В — 2 050; группа Г — < 20 . Установлено, что уровни цистатина С в моче и в сыворотке (мг/л) повышались пропорционально падению СКФ и составляли для u-цистатина С и s-цистатина С: в группе А — $0,00 \pm 0,00$ и $0,71 \pm 0,22$ соответственно; в группе Б — $3,78 \pm 0,52$ и $0,81 \pm 0,35$, в группе В — $5,23 \pm 0,90$ и $2,81 \pm 0$, в группе Г — $8,23 \pm 1,74$ и $4,21 \pm 0,64$ соответственно. Авторы пришли к выводу, что «при развитии СД2 ренальные повреждения сначала затрагивают канальцы и только потом клубочки, вот почему ранние стадии ДН часто связаны с нормоальбуминурией» [49].

В уже упоминавшемся исследовании [30] при наблюдении пациентов с СД2 оказалось, что у лиц с нормоальбуминурией уровни цистатина С в сыворотке и в моче были независимо от других лабораторных показателей положительно связаны с понижением СКФкр до 60

мл/мин./1,73м². Авторы полагают, что «уровни цистатина С в сыворотке и в моче могут быть маркерами ренальной дисфункции у пациентов с СД2 и нормоальбуминурий» [30].

И наконец, большое семилетнее наблюдение (2001–2008) 2 798 пациентов с СД обоих типов и 15 743 лиц без СД. Нормоальбуминуриновая ДН была выявлена у 9,7% лиц с СД, а неальбуминуриновая ХБП у 4,3% лиц без СД. При этом 51,8% лиц с пониженной СКФкр имели нормоальбуминурию [50].

В целом, представления о том, что ДН может быть неальбуминуриновой, выглядят весьма убедительно.

Что такое неальбуминуриновые (nonalbuminuric) ренальные повреждения

Итак, при развитии ДН: 1) появление и утяжеление альбуминурии и снижение СКФ происходят отдельно и 2) в большой степени, независимо друг от друга, 3) на определенных стадиях развитие альбуминурии и снижение СКФ могут перекрывать (идти параллельно) и 4) суммировать свой патофизиологический вклад в утяжеление ДН. Принципиально, что как снижение СКФ, так и альбуминурия — сильные факторы риска коронарных событий, однако именно альбуминурия является более сильным предиктором летальности и прогрессирования к ТСРЗ, чем снижение СКФ [51].

Таким образом, существование альбуминуриного и неальбуминуриного путей развития ДН означает, что «наличие / отсутствие альбуминурии не способно предсказывать развитие ДН и ее прогрессирование к ТСРЗ» [52] и поднимает важные теоретические и практические вопросы: каковы патогенетические механизмы этих двух путей ДН? Как их наличие должно влиять на диагностику и мониторинг ДН и на принятие клинических решений?

Результаты проведенных исследований позволяют сделать следующие предварительные заключения:

- *неальбуминуриновый* путь ДН может быть связан: 1) с превалирующими макрососудистыми повреждениями (макроангиопатией) и (или) 2) с повторными или

с ненормализованными предшествующими эпизодами острого повреждения почек (ОПП), пусть даже и имевшими относительно мягкую тяжесть, 3) с тубулоинтерстициальными повреждениями;

- *альбуминуриный* путь ДН может быть связан: 1) с классической манифестацией диабетической микроангиопатии и 2) с типичными гломерулярными повреждениями [6, 53, 54].

Исследования этих путей привели к тому, что для описания развития СД1 был предложен новый клинический признак «раннее снижение ренальной функции» (early renal function decline) которое: 1) происходит примерно у 23% пациентов при нормоальбуминурии и до начала микроальбуминурии и 2) не обязательно приводит к макроальбуминурии [55].

Так, при наблюдении в течение 14 лет 1 439 пациентов с СД1 у 6,18% из них была выявлена ХБП третьей стадии (СКФкр ниже 60 мл/мин./1,73 м²); у 24% пациентов значения скорости экскреции альбумина (СЭА) составляли менее 30 мг за 24 часа; у 16% пациентов в период до развития третьей стадии ХБП развилась микроальбуминурия (СЭА 30–300 мг за 24 часа). Существенно, что микроальбуминурия имела слабую связь со снижением СКФ. Что касается макроальбуминурии, то она была сильно связана с повышением скорости падения СКФ (5,7% в год против 1,2% в год при СЭА менее 30 мг за 24 часа и с риском падения СКФ ниже 60 мл/мин./1,73 м², составляющим 15,5). Авторы полагают, что «макроальбуминурия — сильный предиктор снижения СКФ и риска ее падения ниже 60 мл/мин./1,73 м². Однако «скрининг с помощью только определения СЭА приводит к выявлению 24% случаев сниженной СКФ» [55].

Таким образом, для дискриминации между альбуминуриновым и неальбуминуриновым фенотипами ДН необходимы раннее: 1) определение СКФцис, 2) выявление тубулярного повреждения (измерение u-цистатина С или u-NGAL) и 3) выявление микроальбуминурии и макроальбуминурии [6, 53, 53].

Ключевым в этой рекомендации является слово «раннее». В данном контексте «раннее» значит «преклиническое».

Прекиническая хроническая болезнь почек

Этот новый термин появился в 2006 году, когда были опубликованы результаты наблюдения в течение 9,3 лет 3 659 пожилых лиц, исходно не имевших известных заболеваний почек, и имевших исходную СКФкр ≥ 60 мл/мин./1,73 м², при этом среднее значение СКФкр составляло 83 мл/мин./1,73 м², а средняя концентрация s-цистатина С 1,0 мг/л, что ниже верхнего предела его нормы (выше 1 мг/л). Результаты показали [56, 57], что у лиц, исходно не имевших ренальной дисфункции, повышение цистатина С на одно значение, соответствующее стандартному отклонению (SD = 0,18 мг/л) имело сильную связь:

- с риском общей смертности, отношение рисков (ОР) — 1,33 (1,25–1,4);
- с сердечно-сосудистой смертностью, ОР — 1,42 (1,30–1,54);
- с не сердечно-сосудистой смертностью, ОР — 1,26 (1,17–1,36);
- со случаями сердечной недостаточности, ОР — 1,28 (1,17–1,40);
- с риском инсульта, ОР — 1,22 (1,08–1,38) и
- с риском инфарктом миокарда, ОР — 1,20 (1,06–1,36).

Принципиально, что повышенные уровни креатина такими предиктивными характеристиками не обладали и предсказывали только сердечно-сосудистую смерть.

Таким образом, прекиническое заболевание почек характеризует лиц:

- без клинических заболеваний почек;
- с СКФ по креатинину ≥ 60 мл/мин./1,73 м²;
- с повышенным уровнем s-цистатина С $\geq 1,0$ мг/л.

Именно «у таких лиц s-цистатин С выявляет „прекиническую“ стадию дисфункции почек, которая сывороточным креатинином не выявляется» [56, 57].

В целом прекиническое заболевание почек независимо от других факторов обуславливает риск разви-

тия клинических заболеваний почек и риск развития ССЗ. Полагается, что «s-цистатин С может быть рекомендован для рутинного скрининга прекинических и клинических заболеваний почек и для оценки риска их средечно-сосудистых осложнений у мужчин старше 55 лет и у женщин старше 60 лет» [58].

Диагностический уровень СКФцис для прекинической болезни почек — 85 мл/мин./1,73 м²

Исследований, направленных на выяснение диагностических показателей прекинической болезни почек, проделано вполне достаточно. Вот что показал мета-анализ 11 исследований, включавших наблюдение 90 755 индивидов общей популяции и пяти исследований, включавших наблюдение 2 960 пациентов с ХБП, средняя длительность наблюдений 7,7 лет [59]:

- в общей популяции количество индивидов с СКФцис ниже 60 мл/мин./1,73 м² составляло 13,7 против 9,7% индивидов с СКФкр ниже 60 мл/мин./1,73 м²;
- диагностический пограничный уровень для диагностики ХБП составлял:
- СКФцис ниже 85 мл/мин./1,73 м², а не ниже 60 мл/мин./1,73 м² (СКФкр) [59].

К каким практическим последствиям приводит определение СКФцис для коррекции оценки рисков неблагоприятных исходов (летальность, сердечно-сосудистые события, ТСРЗ), традиционно проводимых согласно СКФкр?

У лиц с «нормальной» СКФкр, составлявшей 60–89 мл/мин./1,73 м², значения СКФцис *менее 85 мл/мин./1,73 м²* у 14% лиц повысили риск неблагоприятных исходов на 57%.

А у лиц с СКФкр, составлявшей 45–59 мл/мин./1,73 м², определение СКФцис у 42% пациентов лиц снизило риск неблагоприятных исходов на 34%. Особо отметим, что определение СКФцис не приводило к достоверной реклассификации риска ТСРЗ, определяемого с помощью СКФкр. В целом снижение значений СКФцис и СКФцис+кр

ниже пограничного уровня ниже 85 мл/мин./1,73 м² линейно связано с повышением риска кумулятивной смертности и сердечно-сосудистых событий. Авторы полагают, что «несомненно, цистатин С выявляет важный преคลินิกский период снижения ренальной функции до того, когда оно сможет быть диагностировано с помощью только креатинина, длительность такого преคลินิกского периода может составлять 10–20 лет» [59]. Утверждается также, что «тестирование пациентов с преклинически ХБП с помощью определения СКФцис приведет к значительной реклассификации рисков, что, в свою очередь, должно привести к более обоснованной и эффективной терапии, к профилактике осложнений и к снижению экономических затрат» [59].

s-Цистатин С — маркер преклинической ренальной патологии при гипертензии

Многочисленные исследования показали, что пациенты со скрытыми ХБП (occult CKD), невыявляемыми с помощью креатинина, но которые диагностируются с помощью s-цистатина С или измерения ОАК, тем не менее имеют высокий риск смертности и ТСРЗ. Так, наблюдение в течение четырех лет 2925 гипертензивных лиц, не имевших исходного СД, показало, что у индивидов с СКФкр выше 60 мл/мин./1,73 м² наличие ХБП диагностировалось при СКФцис до 60 мл/мин./1,73 м² или при ОАК, составлявшем по крайней мере 30 мг/г. В итоге такие «скрытые» ХБП были диагностированы у 25 % гипертензивных пациентов без СД. Среди пациентов старше 65 лет определение СКФцис выявило 8,9 % лиц со скрытыми ХБП. Повышение возраста на 10 лет повышало наличие скрытой ХБП, выявляемой согласно СКФцис, с отношением рисков, составлявшим 3,0. В целом в США среди пожилых гипертензивных лиц, не имеющих СД, измерение s-цистатина С и определение ОАК выявляет до 25 % лиц со скрытой ХБП, которые с помощью креатинина не выявляются [60].

Нормоальбуминуриновая диабетическая тубулопатия

С чем наиболее сильно связано развитие ренальной дисфункции? С повреждениями клубочков или канальцев? Полагается, что протеинурия может быть результатом как гломерулярных, так и тубулоинтерстициальных повреждений. При протеинурии эпителиальные клетки проксимальных канальцев приобретают провоспалительные и профибротические характеристики и синтезируют различные цитокины и другие регуляторные белки, которые еще в большей степени усиливают прогрессирование интерстициального воспаления и фиброз. Исследование молекулярных механизмов этих процессов привело к пониманию того, что именно повреждение канальцев в первую очередь связаны с ранними стадиями ДН и к специальному термину «диабетическая тубулопатия» [61, 62].

Если это так, то тубулярные маркеры должны повышаться еще при нормоальбуминурии. Так, уровни s-NGAL и u-NGAL измерялись у 50 пациентов с СД1, не имевших клинических признаков нефропатии, контрольная группа 35 здоровых лиц. Уровни s-NGAL у пациентов составляли (нг/мл) 193,7 (103,2–405,4) против 46,4 (39,8–56,2) в контроле, уровни u-NGAL 25,5 (14,2–40,2) против 6,5 (2,9–8,5) соответственно. Оптимальный пограничный уровень u-NGAL для выявления нормоальбуминуриновой диабетической тубулопатии составил 9 нг/мл, значение AUC ROC 0,956, чувствительность 100,0 %, специфичность 80,0 %. Авторы полагают, что «уровни u-NGAL у пациентов с СД1 повышаются перед микроальбуминурией и u-NGAL является маркером нормоальбуминуриновой ДН с хорошей чувствительностью и специфичностью» [63].

Весьма показательны результаты исследования, в котором пять лет наблюдались 50 детей с СД1 (возраст 13,8±4,0 года). Повышенные уровни u-NGAL были у 12 из 38 нормоальбуминуриновых пациентов (31,6%) и у 9 из 12 микроальбуминуриновых (75%). Уровни u-NGAL (нг/мл) составляли: контроль — 5,66±5,08; нормоальбуминурия при СД1—15,69±23,25; микроальбуминурия — 39,14±33,98 [64].

Однако ренальные маркеры диагностируют не только нормоальбуминуриновую диабетическую тубулопатию, но и нормоальбуминуриновую преддиабетическую тубулопатию. В специальном исследовании наблюдался 91 пациент, из которых 61 имел СД2, а у 30 был установлен преддиабет. При нормоальбуминурии средние уровни маркеров составляли: u-NGAL (нг/мл), преддиабет — 18,13±12,44, диабет — 15,52±11,55; u-цистатин С (нг/мл) — 124,90±84,5 — преддиабет и 87,28±57,40 — диабет. Авторы полагают, что «в развитии нефропатии наиболее важную роль играет повреждение канальцев. Повышение уровней u-NGAL и u-цистатина С происходит как на ранних стадиях ДН, так и при преддиабетической нефропатии» [65].

На поздних стадиях ДН велик риск развития ОПП. В США, например, именно ДН в 45 % случаев приводит к ОПП [66], в европейских странах — в 30–35 % случаев [67].

Можно ли оценить риск развития ОПП? Как и насколько заблаговременно? Но сначала несколько слов о новых терминах.

Чем ОПП «лучше», чем ОПН?

С недавних пор, вместо термина «острая почечная недостаточность» (ОПН) применяется термин «острое почечное повреждение» (ОПП). Почему? Полагается, что термин «ОПП» обозначает ренальное повреждение (injury или damage), но не обязательно ренальную дисфункцию. Ренальное повреждение уже может выявляться с помощью новых маркеров, но ренальная дисфункция классическими методами (креатинин, альбумин) еще не манифестируется. Почки, как известно, имеют большой резерв гломерулярной функции, поэтому наличие дисфункции становится очевидным только после того, когда повреждается более 50 % ренальной массы. Таким образом, при развитии ренальной дисфункции снижение СКФкр может быть достаточно поздним событием [68].

Ныне с помощью тубулярных маркеров возможна ранняя диагностика ОПП, когда нарушения гломерулярной функции, оцениваемые креатинином, еще не обнару-

живаются. Именно наличие только тубулярного повреждения при отсутствии видимой гломерулярной дисфункции согласно креатинину и привело к появлению еще одного нового термина «субклинического ОПП». А это, в свою очередь, привело к отказу от традиционной концепции, согласно которой ренальная дисфункция имеет место только тогда, когда есть видимое нарушение фильтрационной функции. Новое понимание концепции ОПП включает в себя два критерия, первый связан с повреждением, которое еще не приводит к снижению ренальной функции, а второй уже с развившейся ренальной дисфункцией. Иначе говоря, повреждение уже есть, но дисфункции пока нет.

Большое количество исследований, включавших наблюдения тысяч пациентов, убедительно показали: ценность новых тубулярных маркеров не только в том, что они диагностируют ОПП раньше, чем креатинин [69], но в первую очередь в том, что они диагностируют повреждение почек при отсутствии манифестируемой ренальной дисфункции [70, 71].

Основное принципиальное отличие ОПП от ОПН в том, что, во-первых, у ОПП есть субклиническая фаза и, во-вторых, что ОПП, в отличие от ОПН, это потенциально обратимая патология. Такая новая концепция может сильно изменить традиционные подходы к диагностике, эпидемиологии, профилактике и лечению ренальных заболеваний. Исследований по диагностике субклинической фазы ОПП проведено достаточно много.

Раннее развитие тубулярной дисфункции: преклиническое ОПП

Согласно статистике, ОПП происходит у 20–30% госпитализированных пациентов, независимо от других клинических факторов ОПП сильно связано с высокой морбидностью и смертностью. Затраты, связанные с терапией ОПП, весьма высоки [72].

Можно ли выявить преклинические стадии развития ОПП? Текущая концепция диагностики ОПП основана на повышении s-креатинина, падении СКФкр и на снижении выхода мочи, что свидетельствует

об утрате экскреторной ренальной функции. И хотя такой диагноз и имеет прогностическое значение [73], он сильно запаздывает и манифестируется обычно через 24–72 часа после того, как реально происходит резкое падение СКФ, определяемое по экзогенному маркеру. Новые маркеры, отражающие тубулярную дисфункцию, позволяют решить эту проблему. Эти маркеры — u-цистатин С (29–31) и в особенности u-NGAL [74].

NGAL выявляет субклиническое ОПП

Весьма показателен мета-анализ 10 проспективных исследований, включавших наблюдение 2322 критически больных пациентов, преимущественно с кадиоренальным синдромом, у которых измерялись уровни NGAL (в сыворотке и в моче) и креатинина (в сыворотке). Все пациенты были разделены на группы, имеющие повышенные (+) или нормальные (–) уровни этих маркеров. Оказалось, что:

- 1296 лиц (55,8%) были NGAL (–)/кр (–); внутригоспитальная смертность составляла 4,8%;
- 445 лиц (19,2%) были NGAL (+)/кр (–); внутригоспитальная смертность 12,4%;
- 107 лиц (4,6%) были NGAL (–)/кр (+); внутригоспитальная смертность 8,4%;
- 474 лица (20,4%) были NGAL (+)/кр (+); внутригоспитальная смертность 14,7%.

Основное открытие: при одновременном измерении s-NGAL или u-NGAL и креатинина комбинация «повышенный NGAL и нормальный креатинин» [(NGAL (+)/кр (–)] выявляет примерно на 40% больше пациентов с развивающимся ОПП, чем только кр (+). При этом измерение NGAL как в сыворотке, так и в моче давало сходную картину по отношению к тяжести исходов.

Полагается, что повышенный уровень NGAL выявляет тубулярные повреждения, которые в течение нескольких дней предшествуют резкому падению ренальной функции, а повышенный креатинин свидетельствует об уже наступившей утрате экскреторных функций.

Авторы считают, что «при отсутствии диагностического повышения сывороточного креатинина NGAL выявляет пациентов с вероятным субклиническим ОПП, у которых повышен риск неблагоприятных исходов (смертность, длительность пребывания в ОИТ, необходимость в заместительной терапии). Концепция и диагностическая формулировка ОПП могут нуждаться в пересмотре» [74].

В итоге в редакционных статьях, недавно опубликованных в международных журналах, подчеркивается, что у 15–20% ренальных пациентов, у которых, согласно креатинину, ОПП нет, в действительности имеется острое тубулярное повреждение, приводящее к ОПП и затем к неблагоприятным исходам. При этом особо подчеркивается, что «при терапии критически больных пациентов оценка того, является ли пациент стабильным или вскоре у него разовьется острая утрата гломерулярной экскреторной функции, должна проводиться несколько раз в день». Все это, по мнению авторов, подтверждает необходимость общего пересмотра концепции и диагностических критериев ОПП путем включения в них измерения маркера тубулярного повреждения [75, 76].

Должны ли измениться клинические рекомендации по диагностике ренальных заболеваний? И что делать, пока они все еще прежние? Как говорится в известной русской поговорке, «как судить будем, по закону или по справедливости?».

Справедливости ради отметим, что текущие международные рекомендации предписывают определять s-цистатин С для подтверждения диагноза ХБП, поставленного только на основании СКФкр менее 60 мл/мин./1,73м² и при отсутствии альбуминурии и повышения других маркеров повреждения почек [77]. Специально отметим, что в США количество лиц с СКФкр в диапазоне 45–59 мл/мин./1,73м² и с отсутствием альбуминурии составляет 4% от всего населения и 54% от пациентов с СКФкр < 60 мл [78]. Тестирование таких лиц с помощью определения СКФцис должно привести к значительной реклассификации их

диагнозов, к более обоснованной эффективной терапии, к профилактике осложнений и к снижению экономических затрат [59].

Заключение. «Что бывает, когда диабетика не читают учебник»

Итак, за последние десятилетия терапия сахарного диабета сильно изменила течение ДН и, надо надеяться, теперь изменит не только наши представления о патогенезе ДН, но и практику ее диагностики, мониторинга и терапии. Вкратце, ключевые изменения в картине течения ДН таковы.

1. При ДН, связанной с СД1, только у трети пациентов развивается микроальбуминурия, только одна треть из них прогрессирует до персистирующей макроальбуминурии, другая треть спонтанно возвращаются к нормоальбуминурии и, более того, не все пациенты с микроальбуминурией прогрессируют до макроальбуминурии.
2. При ДН, связанной с СД2, у 30% пациентов снижение СКФ происходит при нормоальбуминурии, а у 40% пациентов с микроальбуминурией имеет место спонтанная ремиссия к нормоальбуминурии. Причина этих изменений, как предполагается, терапия СД: в частности, отсутствие протеинурии, несмотря на явно сниженную ренальную функцию, может быть вызвано использованием *ингибиторов* ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и препаратами, контролирующими артериальное давление, что замедляет прогрессирование ДН, уменьшает протеинурию и стабилизирует ренальную функцию. Лица со сниженной ренальной функцией и нормоальбуминурией могли иметь протеинурию в прошлом, но за счет терапии стали нормоальбуминуриновыми [79].
3. При ДН появление и утяжеление альбуминурии и снижение СКФ происходят раздельно и в большей степени независимо друг от друга.
4. На определенных стадиях развитие альбуминурии и снижение СКФ могут перекрываться (идти параллельно) и суммировать свой патофизиологический вклад в утяжеление ДН.

5. *Альбуминуриновый* путь ДН может быть связан: а) с классической манифестацией диабетической микроангиопатии и 2) с типичными гломерулярными повреждениями.
6. *Неальбуминуриновый* (нормоальбуминуриновый) путь ДН может быть связан: а) с превалирующими макрососудистыми повреждениями (макроангиопатией) и (или) б) с повторными или с предшествовавшими ненормализованными эпизодами ОПП, пусть даже и имевшими относительно мягкую тяжесть, в) с *тубулоинтерстициальными* повреждениями (диабетической тубулопатией).
7. «Сначала канальцы, потом клубочки». Именно тубулопатия — самая ранняя стадия ДН, которая ведет: а) сначала к гиперфилтрации, б) потом к ухудшению гломерулярной функции (что манифестируется как «возвращение к нормофилтрации»), потом в) к гипофилтрации и т.д.; чем выше была гиперфилтрация, тем ниже будет СКФ.
8. Для диагностики ДН необходимы новые маркеры: а) цистатин С, измеряемый в крови (маркер гломерулярной функции) и в моче (маркер тубулярной дисфункции) и б) NGAL, измеряемый в крови и в моче — ранний маркер острого повреждения почек.
9. Цистатин С выявляет нормоальбуминурических пациентов с риском развития ДН, гиперфилтрацию и раннюю гипофилтрацию, является маркером преклинической хронической болезни почек.
10. NGAL — маркер тубулярной дисфункции, выявляет нормоальбуминурических пациентов с риском развития ДН и субклиническое ОПП.

Более подробную информацию можно найти в недавних обзорах [6, 34, 53, 75, 76, 80], один из которых прямо так и называется: «Непротеинуриновая диабетическая нефропатия: что бывает, когда диабетика не читают учебник» [79].

Благодарности. Автор благодарит кандидата биологических наук Соловьеву И. В. (АО «ДИАКОН») за помощь в работе над текстом.

Список литературы

1. Foley RN, Murray AM, Li S, Herzog CA et al. Chronic kidney disease and the risk for cardiovascular disease, renal replacement, and death in the United States Medicare population, 1998 to 1999. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:489–95.
2. Mogensen CE Microalbuminuria, blood pressure and diabetic renal disease: origin and development of ideas. *Diabetologia* 1999; 42:263–285.
3. Hovind P, Tarnow L, Rossing P, et al. Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study. *BMJ*. 2004;328(7448):1105.
4. Kramer HJ, Nguyen QD, Curhan G et al. Renal insufficiency in the absence of albuminuria and retinopathy among adults with type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2003; 289: 3273–3277.
5. Molitch ME, Steffes M, Sun W et al. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care*. 2010;33: 1536–43.
6. Pugliese G. Updating the natural history of diabetic nephropathy. *Acta Diabetol*. 2014;51(6):905–15.
7. Вельков В. В. Цистатин С: новые возможности и новые задачи для лабораторной диагностики. Часть 1. Клинико-лабораторный консиллиум. Научно-практический журнал. 2010, 5, (36), 23–31.
8. Вельков В. В. Цистатин С: новые возможности и новые задачи для лабораторной диагностики. Часть 2. Клинико-лабораторный консиллиум. Научно-практический журнал. 2011, 1, (37), 27–38.
9. Вельков В. В. Цистатин С: новые возможности и новые задачи для лабораторной диагностики. Часть 3. Клинико-лабораторный консиллиум. Научно-практический журнал. 2011, 2, (38), 31–39.
[http://www.diakonlab.ru/files/Docs/SciArticles/Cystatin_C_Rev_Site\(2\).pdf](http://www.diakonlab.ru/files/Docs/SciArticles/Cystatin_C_Rev_Site(2).pdf).
10. Shlipak MG, Mattes MD, Peralta CA. Update on cystatin C: incorporation into clinical practice. *Am J Kidney Dis*. 2013 Sep;62(3):595–603.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755100/pdf/nihms483055.pdf>.
11. Dharnidharka V. R., Kwon C., Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2002; 40: 221–226.
12. Hoek FJ, Kemperman FA, Krediet RT. A comparison between cystatin C, plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(10):2024–31.
13. Вельков В. В., NGAL — «ренальный тропонин», ранний маркер острого повреждения почек: актуальность для нефрологии и кардиохирургии. Клинико-лабораторный консиллиум, Научно-практический журнал. 2011, № 4 (40), 24–43.
14. Haase-Fielitz A1, Haase M, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: a critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem*. 2014; 51(Pt 3):335–51.
15. Singer E, Markó L, Paragas N et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013;207(4):663–72.
16. Oh SJ, Lee JI, Ha WC et al. Comparison of cystatin C- and creatinine-based estimation of glomerular filtration rate according to glycaemic status in Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2012;29(7):121–5.
17. Bevc S, Hojs R, Ekart R et al. Simple cystatin C formula for estimation of glomerular filtration rate in overweight patients with diabetes mellitus type 2 and chronic kidney disease. *Exp Diabetes Res*. 2012; 2012:179849.
18. Jeon YL, Kim MH, Lee WI et al. Cystatin C as an early marker of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Clin Lab*. 2013;59(11–12):1221–9.

19. Magnusson M, Hedblad B, Engström G et al. High levels of cystatin C predict the metabolic syndrome: the prospective Malmö Diet and Cancer Study. *J Intern Med*. 2013;274(2):192–9.
20. Surendar J, Indulekha K, Aravindhan V, et al. Association of cystatin-C with metabolic syndrome in normal glucose-tolerant subjects (CURES-97). *Diabetes Technol Ther*. 2010;12(11):907–12.
21. Uruska A, Araszkievicz A, Zozulinska-Ziolkiewicz D et al. Does serum cystatin C level reflect insulin resistance in patients with type 1 diabetes? *Clin Biochem*. 2014;47(13–14):1235–8.
22. Lee SH, Park SA, Ko SH et al. Insulin resistance and inflammation may have an additional role in the link between cystatin C and cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus patients. *Metabolism*. 2010;59(2):241–6.
23. Nashar K, Egan BM. Relationship between chronic kidney disease and metabolic syndrome: current perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2014;7:421–35.
24. Prasad GV. Metabolic syndrome and chronic kidney disease: Current status and future directions. *World J Nephrol*. 2014;3(4):210–9.
25. Peralta CA, Katz R, Sarnak MJ et al. Cystatin C identifies chronic kidney disease patients at higher risk for complications. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(1):147–55.
26. He R, Shen J, Zhao J et al. High cystatin C levels predict severe retinopathy in type 2 diabetes patients. *Eur J Epidemiol* 2013, 28, 9, 775–8.
27. Hu Y, Liu F, Shen J et al. Association between serum cystatin C and diabetic peripheral neuropathy: a cross-sectional study of a Chinese type 2 diabetic population. *Eur J Endocrinol*. 2014;171(5):641–8.
28. Singh DK, Winocour P, Farrington K. Mechanisms of disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008;4(4):216–26.
29. Satoh-Asahara N, Suganami T, Majima T, et al. Urinary cystatin C as a potential risk marker for cardiovascular disease and chronic kidney disease in patients with obesity and metabolic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(2):265–73.
30. Jeon YK, Kim MR, Huh JE et al. Cystatin C as an early biomarker of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *J Korean Med Sci*. 2011;26(2):258–63.
31. Kim SS, Song SH, Kim IJ et al. Urinary cystatin C and tubular proteinuria predict progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 2013;36(3):656–61.
32. Zerbini G, Bonfanti R, Meschi F et al. Persistent renal hypertrophy and faster decline of glomerular filtration rate precede the development of microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2006;55(9):2620–5.
33. Palatini P, Benetti E, Zanier A, et al. Cystatin C as predictor of microalbuminuria in the early stage of hypertension. *Nephron Clin Pract*. 2009;113(4):309–14.
34. Вельков В. В., Новые представления о диабетической нефропатии: гиперфильтрация, прерывистая микроальбуминурия, солевой парадокс. Медицинский алфавит. Современная лаборатория, 2013, 5–23.
http://diakonlab.ru/vse_novosti/actual_scinews/diabeticheskaya_nefropatiya_v_treh_izmereniyah_giperfiltratsiya_albumin_kreatinina/
35. Helal I, Fick-Brosnahan GM, Reed-Gitomer B et al. Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(5):293–300.
36. Palatini P. Glomerular hyperfiltration: a marker of early renal damage in pre-diabetes and pre-hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(5):1708–14.
37. Perkins BA, Nelson RG, Ostrander BE et al. Detection of renal function decline in patients with diabetes and normal or elevated GFR by serial measurements of serum cystatin C concentration: results of a 4-year follow-up study. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(5):1404–12.
38. Perkins BA, Ficociello LH, Ostrander BE et al. Microalbuminuria and the risk for early progressive renal function decline in type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(4):1353–61.
39. Krolewski AS, Niewczas MA, Skupien J et al. Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progression to macroalbuminuria. *Diabetes Care*. 2014;37(1):226–34.
40. Papadopoulou-Marketou N, Skevaki C, Kostiri I et al. NGAL and cystatin C: two possible early markers of diabetic nephropathy in young patients with type 1 diabetes mellitus: one year follow up. *Hormones (Athens)*. 2015;14(2):232–40.
41. Lane PH, Steffes MW, Mauer SM. Glomerular structure in IDDM women with low glomerular filtration rate and normal urinary albumin excretion. *Diabetes* 1992, 41:581–586.
42. Tsalamandris C, Allen TJ, Gilbert RE et al., Sinha A, Panagiotopoulos S, Cooper ME, Jerums G (1994) Progressive decline in renal function in diabetic patients with and without albuminuria. *Diabetes* 43:649–655.
43. Kramer CK, Leitao CB, Pinto LC, et al. Clinical and laboratory profile of patients with type 2 diabetes with low glomerular filtration rate and normal albuminuria. *Diabetes Care* 2007; 30: 1998–2000.
44. Dwyer JP, Parving HH, Hunsicker LG, et al. Renal dysfunction in the presence of normoalbuminuria in type 2 diabetes: results from the DEMAND study. *Cardiorenal Med* 2012, 2:1–10
45. Rodríguez-Poncelas A, Garre-Olmo J, Franch-Nadad J, et al. (2013) RedGDPS Study Group Prevalence of chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes in Spain: PERCEDIME2 study. *BMC Nephrol*. 2013, 14:46.
46. Retnakaran R, Cull CA, Thorne KI, Adler AI, Holman RR; UKPDS Study Group (2006) Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74. *Diabetes*. 2006, 55:1832–1839.
47. Boronaf M, García-Cantón C, Quevedo V, et al. Non-albuminuric renal disease among subjects with advanced stages of chronic kidney failure related to type 2 diabetes mellitus. *Ren Fail*. 2014;36(2):166–70.
48. Pavkov ME, Knowler WC, Lemley KV et al. Early renal function decline in type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(1):78–84.
49. Rao X, Wan M, Qiu C et al. Role of cystatin C in renal damage and the optimum cut-off point of renal damage among patients with type 2 diabetes mellitus. *Exp Ther Med*. 2014;8(3):887–892.
50. Motil AK, Kwon KS, Mauer M et al. Normoalbuminuric diabetic kidney disease in the U.S. population. *J Diabetes Complications*. 2013;27:123–127.
51. de Boer IH, Steffes MW. Glomerular filtration rate and albuminuria: twin manifestations of nephropathy in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2007, 18:1036–1037.
52. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. The need for early predictors of diabetic nephropathy risk: is albumin excretion rate sufficient? *Diabetes* 2000;49:1399–1408.
53. Currie G, McKay G, Delles C. Biomarkers in diabetic nephropathy: Present and future. *World J Diabetes*. 2014;5(6):763–76.
54. Mora-Fernández C, Domínguez-Pimentel V, de Fuentes MM et al., Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics. *J Physiol*. 2014;592(Pt 18):3997–4012.
55. Molitch ME, Steffes M, Sun W et al. Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care*. 2010;33(7):1536–43.
56. Shlipak MG, Katz R, Sarnak MJ et al. Cystatin C and prognosis for cardiovascular and kidney outcomes in elderly persons without chronic kidney disease. *Ann Intern Med*. 2006;145(4):237–46.
57. Shlipak MG, Praught ML, Sarnak MJ., Update on cystatin C: new insights into the importance of mild kidney dysfunction. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006; 15: 270–275.
58. Shlipak MG. Cystatin C: research priorities targeted to clinical decision making. *Am J Kidney Dis* 2008; 51:358–61.
59. Shlipak MG, Matsushita K, Ärnlöv J et al. Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function. *N Engl J Med*. 2013;369(10):932–43.
60. Peralta CA, Weekley CC, Li Y et al. Occult chronic kidney disease among persons with hypertension in the United States: data from the National Health and Nutrition Surveys 1988–1994 and 1999–2002. *J Hypertens*. 2013;31(6):1196–202.
61. Tang SC, Leung JC, Lai KN. Diabetic tubulopathy: an emerging entity. *Contrib Nephrol*. 2011;170:124–34.
62. Tang SC, Lai KN. The pathogenic role of the renal proximal tubular cell in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(8):3049–56.
63. Lacquaniti A, Donato V, Pintaudi B et al. “Normoalbuminuric” diabetic nephropathy: tubular damage and NGAL. *Acta Diabetol*. 2013;50(6):935–42.
64. Hafez MH, El-Mougy FA, Makar SH et al. Detection of an earlier tubulopathy in diabetic nephropathy among children with normoalbuminuria. *Iran J Kidney Dis*. 2015;9(2):126–31.
65. Garg V, Kumar M, Mahapatra HS, et al. Novel urinary biomarkers in pre-diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol*. 2015 Jan 30.
66. Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S. End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis*. 1999; 34: 795–808.
67. Atkins RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2005;67:14–18.
68. Ronco C, Kellum JA, Haase M. Subclinical AKI is still AKI. *Crit Care*. 2012;16(3):313.
69. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. NGAL Meta-analysis Investigator Group: Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2009, 54:1012–1024.
70. Haase M, Devarajan P, Haase-Fielitz A et al. The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: a multicenter pooled analysis of prospective studies. *J Am Coll Cardiol* 2011, 57:1752–1761.
71. Nickolas TL, Schmidt-Ott KM, Caneffa P et al. Diagnostic and Prognostic Stratification in the Emergency Department Using Urinary Biomarkers of Nephron Damage. A Multicenter Prospective Cohort Study. *J Am Coll Cardiol* 2012, 59:246–255.
72. Chertow GM, Burdick E, Honour M, et al. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3365–70.
73. Uchino S, Bellomo R, Goldsmith D, et al. An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients. *Crit Care Med* 2006;34:1913–7.
74. Haase M, Devarajan P, Haase-Fielitz A et al. The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury a multicenter pooled analysis of prospective studies. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(17):1752–61.
75. Haase M, Kellum JA, Ronco C. Subclinical AKI — an emerging syndrome with important consequences. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(12):735–9.
76. Bagshaw SM. Subclinical acute kidney injury: a novel biomarker-defined syndrome. *Crit Care Resusc*. 2011; 13(3):201–3.
77. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013;3:1–150.
78. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet* 2012;379:165–80.
79. Dwyer JP, Lewis JB. Nonproteinuric diabetic nephropathy: when diabetics don't read the textbook. *Med Clin North Am*. 2013;97(1):53–8.
80. Tonolo G, Cherchi S. Tubulointerstitial disease in diabetic nephropathy. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2014;21:7:107–15.





Точная диагностика -
эффективное лечение!

Наборы реагентов для иммуноферментной и Real-time ПЦР-диагностики герпесвирусных инфекций, обусловленных:

- » Вирусом простого герпеса 1 и 2 типов
- » Вирусом простого герпеса 2 типа
- » Человеческим герпес-вирусом 6 типа
- » Человеческим герпес-вирусом 8 типа
- » Вирусом Эпштейн-Барр
- » Вирусом Варицелла-Зостер
- » Цитомегаловирусом



А также широкий спектр наборов для выявления:

ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов А, В, С, D, E; TORCH-инфекций; ИППП, беременности, паразитарных и желудочно-кишечных заболеваний; опухолевых маркеров, гормонов, цитокинов, и др.

Наборы реагентов для определения биохимических показателей.

ЗАО «Вектор-Бест»

630117, Новосибирск-117, а/я 492
тел./факс: (383) 227-73-60,
332-81-34, 332-67-49
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
www.vector-best.ru

Представительства:

Москва: (495) 710-76-96
Санкт-Петербург: (812) 495-55-99
Ростов-на-Дону: (863) 295-15-61
Екатеринбург: (343) 372-90-50

Уфа: (347) 246-23-34

Нижний Новгород: (831) 270-48-53
Хабаровск: (4212) 335-946
Киев: (10 380 44) 220-04-04



- Национальный дистрибьютор Российских препаратов.
- Работает с более чем 2 500 клиентов.
- Логистическое обеспечение.
- Минимальные сроки поставки.
- Доставка в любую точку мира.
- Более 10 тысяч наименований продукции.

***Высокое качество обслуживания
и доступные цены***

**Широкий ассортимент товаров на складе
следующих производителей:**

ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава РФ

ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора РФ п. Оболенск

ФГУП НИИВС ФМБА, г. Санкт-Петербург

БИОКОМПАС, г. Углич

НИЦФ, г. Санкт-Петербург

К Вашим услугам:

Единая справочная служба.

Доставка любыми видами транспорта.

Автоматическое формирование заказа.

Эпидбиомед-диагностика предлагает:

ИФА тест системы

Оборудование

Биохимию

***Диагностируйте на диагностике
от «Эпидбиомед-диагностика»***

ООО «Эпидбиомед-диагностика»

111672, г. Москва, ул. Салтыковская, д. 26, стр. 1,

Тел.: (495) 7-999-000, E-mail: zakaz@epidbiomed-d.ru

www.epidbiomed-d.ru



Л. Б. Дрыгина



Т. В. Горейко

Метод иммуноблота в диагностике хронической инфекции вируса Эпштейна-Барр

Л. Б. Дрыгина, д.б.н., проф., зав. клинико-диагностической лабораторией, вед. научный сотрудник отдела лабораторной диагностики

Т. В. Горейко, к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики клинико-диагностической лаборатории отдела лабораторной диагностики

ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург

Immunoblotting method in diagnosis of chronic Epstein-Barr virus infection

L. B. Drygina, T. V. Goreyko

The Russian Center for Emergency and Radiation Medicine n.a. A. M. Nikiforov (EMERCOM), Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Целью исследования являлось изучение диагностических возможностей метода иммуноблота для выявления инфекции вируса Эпштейна-Барр и определения стадии инфекционного процесса. Проанализированы и сопоставлены результаты иммуноферментного анализа и иммуноблота у пациентов с хронической инфекцией вируса Эпштейна-Барр. Показана перспективность применения иммуноблота для подтверждения диагноза ВЭБ-инфекции и определения стадии инфекционного процесса.

Ключевые слова: инфекция вируса Эпштейна-Барр, иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг.

Summary

The aim of the study was to investigate diagnostic capabilities by immunoblotting to detect the infection of Epstein-Barr virus and determine the stage of infection process. Analyzed and compared the results of immunoassay and immunoblot patients with chronic EBV-infection. The prospects of the use of immunoblotting to confirm the diagnosis of EBV-infection and determine the stage of infection.

Key words: infection Epstein-Barr virus, enzyme immunoassay, immunoblotting.

Введение

Инфицированность вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) имеет широкое распространение и охватывает около 90 % населения планеты. В настоящее время установлена патогенетическая значимость ВЭБ в развитии инфекционных проявлений не только у детей, но и взрослых [1, 2]. Наряду с известной ролью ВЭБ, как возбудителя инфекционного мононуклеоза (ИМ), лимфомы Беркитта и носоглоточной карциномы, доказан его вклад в развитие аутоиммунной патологии и синдрома хронической усталости [4, 6, 9].

Наиболее частым типичным и хорошо изученным еще в 70-е годы XX века проявлением первичной инфекции, вызванной ВЭБ (ИВЭБ), является ИМ, возникающий в 50 % случаев при инфицировании в юношеском или детском возрасте [5, 10, 11]. В качестве единственных лабораторных критериев диагностики ИМ длительное время

служило появление атипичных мононуклеаров в клиническом анализе крови и неспецифических гетерофильных антител в реакции Пауля-Буннеля [16].

Хроническая персистирующая инфекция, вызванная ВЭБ (ХИВЭБ), практически не исследована [7, 8]. Принято считать, что ХИВЭБ имеет выраженные клинические проявления только на фоне тяжелой депрессии иммунной системы, например, при иммуносупрессивной терапии, синдроме приобретенного иммунодефицита [1]. Однако в последние годы наметился рост клинических проявлений ХИВЭБ у пациентов без тяжелой иммунной патологии [3]. Подобная динамика определяется, с одной стороны, развитием иммунодепрессии, обусловленной неблагоприятными факторами внешней и внутренней среды [6, 12, 14], с другой стороны, появлением новых методов лабораторной диагностики ИВЭБ [4, 15].

Несмотря на появление новых лабораторных технологий, применяемых для установления ИВЭБ, до сих пор нет определенности в отношении диагностической ценности многих из них [15]. Методы иммуноферментного анализа (ИФА) и различные варианты иммуноблота (ИБ), которые в настоящее время стали использоваться при серологическом исследовании, различаются по спектру определяемых антигенных белков ВЭБ. В настоящее время не накоплен достаточный отечественный опыт по применению ИБ в диагностике ИВЭБ и определении стадий течения инфекции.

Значительный рост атипичных форм ИВЭБ среди взрослого населения, неопределенности при выборе метода выявления ВЭБ-инфекции и сложности при интерпретации результатов лабораторных исследований указывают на актуальность проблемы.

Материалы и методы исследования

Группа пациентов с ХИВЭБ состояла из 345 человек, которые проходили обследование и лечение в клинике ВЦЭРМ. Женщин было 57% (n = 197), мужчин — 43% (n = 148). Возраст пациентов составлял от 22 до 69 лет (средний возраст $39,0 \pm 11,7$ лет).

Критериями отбора пациентов в группу ХИВЭБ являлось наличие жалоб: быстрая утомляемость, общая слабость, эмоциональная лабильность, депрессивные состояния, бессонница, головная боль, ознобы, дискомфорт в горле, боли в мышцах. В работу не включались лица с наличием симптомов острой ИВЭБ и атипичных лимфоцитов в крови, а также лица, имеющие сопутствующие аутоиммунные заболевания, клинические проявления и наличие лабораторных маркеров ВИЧ первого и второго типов, вирусных гепатитов, онкологических заболеваний, психические расстройства, больные после химио- или лучевой терапии.

В условиях клинической лаборатории пациентам проводились определение специфических антител к белкам ВЭБ методом ИФА, молекулярных особенностей белков ВЭБ методом ИБ и общий анализ крови.

Для определения антител IgM к VCA p18, IgG к EBNA-1 p72 и EA p138 ВЭБ использовались коммерческие диагностические тест-системы «ВектоВЭБ-VCA-IgM», «ВектоВЭБ-NA-IgG» и «ВектоВЭБ-EA-IgG» («ВЕКТОР-БЕСТ», Россия), IgG к VCA ВЭБ — «ДС-ИФА-АНТИ-ВЭБ-VCA-G» («Диагностические системы», Россия). С помощью тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-ВЭБ-VCA-G — АВИДНОСТЬ» («Диагностические системы», Россия) определялся индекс avidности IgG-VCA.

При проведении ИБ использовалась тест-система «Anti-EBV-Profile 2 EUROLINE IgG», (EUROIMMUN, Германия). В сыворотке крови одновременно выявлялись антитела IgG к пяти белковым антигенам ВЭБ с различной молекулярной массой: VCA gp125 — нативный белок, VCA p19 — рекомбинантный белок, EBNA-1 — рекомбинантный, p22 — рекомбинантный белок, EA-D — рекомби-

Клинические проявления	Количество, абсолютное	Количество, %
Астеновегетативный синдром	345	100
Поражения лимфоглоточного кольца	231	67
Периферическая лимфоаденопатия	162	47
Артралгия, миалгия, невралгия	131	38
Субфебрилитет	107	31
Гепатобилиарный синдром	41	12

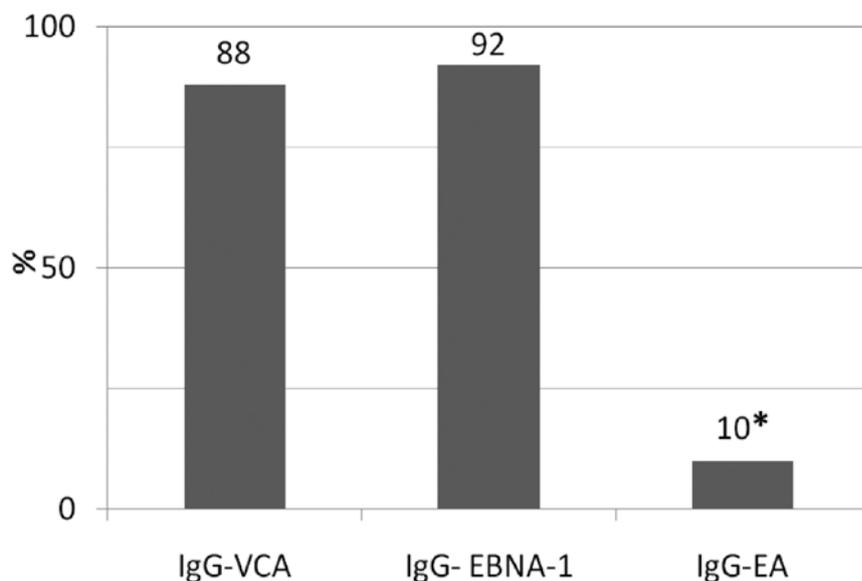


Рисунок 1. Частота выявления IgG к антигенам ВЭБ у пациентов с ХИВЭБ методом ИФА. Примечание: * — различие с частотой выявления IgG к VCA и NA достоверно ($p < 0,001$, Пирсон и хи-квадрат).

нантный. Для выполнения процедур ИБ использовалась автоматизированная система ProfiBLOT 48 (TECAN Austria GmbH, Австрия). Результаты ИБ обрабатывались при помощи компьютерной программы EuroLineScup в полуколичественном выражении.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007, Statistica 6.0.

Результаты

При клиническом обследовании пациентов обращали внимание на увеличение лимфатических узлов, субфебрилитет, гиперемию зева. У некоторых больных имело место увеличение печени и селезенки (табл. 1).

Данные клинического обследования свидетельствовали о полиморфном и неспецифичном характере, тем не менее клинические проявления были стойкими.

Для подтверждения этиологии ВЭБ в возникновении симптомов заболевания у обследованных пациентов с подозрением на ХИВЭБ были использованы серологические методы исследования.

На первом этапе работы проведено полуколичественное определение продукции специфических IgG к капсидному (VCA), нуклеарным (NA) и ранним (EA) белкам ВЭБ методом ИФА (рис. 1). У обследованных не были выявлены антитела класса М к капсидному белку VCA, что позволило исключить острую ВЭБ-инфекцию.

Показано, что у обследованных пациентов чаще выявлялись антитела класса G направленные к VCA и NA, чем к EA ($p < 0,001$), что подтверждало наличие хронической ВЭБ-инфекции.

У обследованных пациентов антитела IgG к VCA выявлялись в 305 (88%) из 345 случаев, а к NA ВЭБ —

Таблица 2
Частота выявления различных профилей специфического гуморального ответа при ХИВЭБ

Профили антител к антигенам ВЭБ	Количество пациентов	Количество пациентов, %
VCA+NA	245	71
VCA+NA+EA	36	10
VCA	25	7
NA	39	12

Таблица 3
Сопоставимость методов ИФА и ИБ

Метод	Серологический маркер	Спектр вирусных белков	Класс антител	Результат	
				«+»	«-»
ИФА	EA	p138	IgG	10 (12%)	70 (88%)
ИБ	EA	EA-D	IgG	21 (26%)	59 (74%)
ИФА	VCA	p18	IgG	66 (83%)	14 (17%)
ИБ	VCA	gp 125	IgG	65 (81%)	15 (19%)
		p19	IgG	66 (83%)	14 (17%)
		p22	IgG	59 (74%)	21 (26%)
ИФА	EBNA-1	p72	IgG	65 (81%)	15 (19%)
ИБ	EBNA-1	p79	IgG	61 (76%)	19 (24%)

320 (92%) из 345 пациентов с ХИВЭБ и были наиболее часто определяемыми серологическими маркерами.

Частота выявления IgG к раннему белку EA была достоверно ниже, чем IgG к NA и к VCA и составляла 10% (n = 36).

Характеристика фенотипических профилей специфического гуморального иммунного ответа при ХИВЭБ представлена в табл. 2.

Показано, что у пациентов с ХИВЭБ достоверно чаще выявлялось сочетание антител класса G к VCA и NA (p < 0,001), что являлось отражением хронической персистенции вируса.

У 10% (n = 36) пациентов были определены антитела к VCA, NA и EA. Появление в сыворотке антител класса G к этим белкам отражало активацию хронического процесса.

«Изолированное» выявление IgG к VCA регистрировалось в 7% случаев (n = 25). Оценка стадии инфекционного процесса у этих пациентов не могла быть однозначной и требовала дополнительных диагностических подходов, позволяющих определять антитела к пептидам gp125, p22 и p19 VCA вируса.

В ходе исследования ни у одного из пациентов не было выявлено сочетания антител IgG к EA+VCA. Важно отметить, что данный профиль спе-

цифических антител ассоциирован с ВЭБ-связанными онкологическими заболеваниями (Gulley M. L. et al., 2008).

«Изолированное» выявление антител к NA в 12% можно интерпретировать как стадию перенесенного инфекционного процесса с «потерей» синтеза IgG к VCA (паст-инфекция) или элиминацию ВЭБ. Их определение имело ретроспективное значение.

Для установления или подтверждения инфекционного процесса с определением стадии жизненного цикла вируса у пациентов с наличием IgG к VCA при отсутствии IgG к NA был использован метод ИБ (n = 25).

Среди пациентов с фенотипическим профилем специфического гуморального ответа VCA в 80% случаев методом ИБ выявлялись антитела IgG к VCA gp125 при соотношении gp125/p22 более единицы, что свидетельствовало об обострении инфекции. Антитела IgG к VCA p19, маркера завершения обострения инфекционного процесса, были выявлены у пяти (20%) пациентов с ХИВЭБ.

Низкоавидные антитела IgG к VCA с индексом авидности меньше 60% были выявлены в 14% случаев (n = 34) среди пациентов с профилем антител к VCA+NA, в 8% (n = 3) — с профилем антител к VCA+NA+EA. У пациентов с изолированным выявлением антител к VCA низкоавид-

ные антитела не определялись. При использовании ИБ у всех пациентов с низким индексом авидности были обнаружены IgG к VCA p22 — маркеру давней ИВЭБ.

Для сравнения ИФА и ИБ из общей группы пациентов с ХИВЭБ методом случайно выборки были отобраны 80 человек (табл. 3).

Технология ИБ позволила установить наличие антител класса G к ранним белкам ВЭБ — EA-D у 21 пациента (26%). Таким образом, было показано, что диагностическая ценность выявления антител к ранним белкам ВЭБ методом ИБ в два раза выше, чем методом ИФА.

Представленные в табл. 3 данные указывают на сопоставимость методов ИФА и ИБ по выявлению антител класса G к VCA (83%). Преимущество метода ИБ заключалось в возможности выявления антител к вирусному капсидному антигену gp125 — маркеру обострения инфекции, и p22 — маркеру давности инфекционного процесса.

Положительные результаты IgG к EBNA-1 в ИФА (81%) превалировали над результатами IgG к EBNA-1 в ИБ (76%), однако различия были недостоверные. Установленные вариации результатов ИФА и ИБ объяснялись различием используемых в исследовании рекомбинантных вирусных антигенов — p72 и p79 — и давали возможность полагать, что антитела, направленные к EBNA-1 p72, продуцируются чаще, чем к EBNA-1 p79.

Таким образом, показана дополнительная диагностическая значимость метода ИБ при выявлении у пациентов только IgG к VCA методом ИФА. Метод ИБ является более чувствительным при реактивации ХИВЭБ. Использование индекса авидности IgG к VCA для определения давности инфекционного процесса не всегда является надежным. Альтернативой данному тесту может быть определение антител IgG к p22 вирусного белка VCA методом ИБ.

Заключение

У пациентов с хронической ВЭБ-инфекцией достоверно чаще выявляются антитела класса IgG к нуклеарным EBNA-1 и капсидным белкам VCA (92 и 88% соответствен-

но); а антитела IgG к ранним антигенам ЕА — в 10% случаев.

Специфический гуморальный иммунный ответ при хронической ВЭБ-инфекции в 71% случаев представлен VCA+EBNA-1; в 12% — EBNA-1; в 10% — VCA+EBNA-1+EA; в 7% случаев — VCA.

Использование метода иммуноблота позволило в два раза чаще выявлять антитела к ранним антигенам по сравнению с традиционным методом ИФА, при этом частота обнаружения ядерных и капсидных белков разными методами анализа была сопоставимой.

Методом иммуноблота среди пациентов с профилем антител класса G к VCA в 80% случаев была установлена активация хронической ВЭБ-инфекции, которая характеризовалась наличием антител IgG к gp125 и соотношением gp125/p22 выше единицы.

Список литературы

1. Алексеев А. В. Полиморфизм проявлений Эпштейна-Барр вирусной инфекции в практике врача дерматовенеролога. // А. В. Алексеев. // Дніпровський медичний часопис.— 2009.— Том 1, № 4.— С. 15–19.
2. Басков С. С. Современные подходы к лечению аутоиммунного панкреатита, ассоциированного с активной герпесвирусной инфекцией, у участников ликвидации аварии на Чернобыльской АЭС. // С. С. Басков, А. А. Андреев. // Мед.— биол. и соц.— психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях.— 2011.— № 2.— С. 23–27.
3. Бошняк Р. Е. Инфекция, вызванная вирусом Эпштейна-Барр: эпидемиологические проявления и лабораторная диагностика: автореф. дис... к-та мед. наук. // Бошняк Р. Е.— М., 2009.— 25 с.
4. Долгих Т. И. Современная стратегия лабораторной диагностики герпесвирусных инфекций, ассоциированных с перинатальной патологией. // Т. И. Долгих. // Справочник заведующего КДЛ.— 2011.— № 4.— С. 21–32.
5. Иванова В. В. Иммунопатогенез инфекционной болезни у детей. // В. В. Иванова, Г. Ф. Железникова, И. В. Шилова. // Педиатрия.— 2005.— № 4.— С. 61–65.
6. Исаков В. А. Герпесвирусная инфекция. // В. А. Исаков, С. Б. Рыбалкин, М. Г. Романцов. // Рекомендации для врачей: СПб, 2006.— С. 95.
7. Клинические формы хронической Эпштейн-Барр-вирусной инфекции: вопросы диагностики и лечения. // И. К. Малашенкова, Н. А. Дидковский, Ж. Ш. Сарсания и [др.]. // Леч. врач.— 2009.— № 9.— С. 32–38.
8. Павленко О. А. Роль вируса Эпштейна-Барр в патологии верхних отделов пищеварительного тракта у детей. // О. А. Павленко, В. А. Щербак. // Дальневосточный мед. журнал.— 2009.— № 3.— С. 53–55.
9. Применение аллокина-альфа в терапии вирусных инфекций. // Ф. И. Ершов, В. А. Исаков, Г. П. Беккер и [др.]. // Руководство для врачей: Москва — Санкт-Петербург, 2008.— 115 с.
10. Самарин Д. В. Современные подходы к диагностике Эпштейна-Барр вирусной инфекции. // Д. В. Самарин. // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія.— 2008.— № 2.— С. 15–18.
11. Тимченко В. Н. Инфекционные болезни у детей. // В. Н. Тимченко.— СПб.: СпецЛит, 2001—597 с.
12. Epstein-Barr Virus quantitation by real-time PCR targeting Multiple Gene Segments. A novel approach to screen for the Virus in paraffin-embedded tissue and plasma. // J. L. Ryan, H. Fan, S. L. Glasser, S. A. Schichman, N. Raab-Traub, M. L. Gulley. // JMD.— Vol. 6 (4) — P. 378–385.
13. Gulley M. L. Laboratory Assays for Epstein-Barr Virus-Related Disease. // M. L. Gulley, W. Tang. // J. Mol. Diagn.— 2008.— Vol. 10 (4).— P. 279–292.
14. Ozone hole and Southern Hemisphere climate change. // S. W. Son, N. F. Tandon, L. M. Polvani, D. W. Waugh. // Geophysical Research Letters — 2009.— P. 36.
15. Siennicka J. Laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infection. // J. Siennicka, A. Trzcińska. // Med. Dosw. Mikrobiol.— 2007.— Vol. 59 (3).— P. 259–266.
16. Straus S. E. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. // S. E. Straus, J. I. Cohen, G. Tosato, J. Meier. // Ann. Intern. Med.— 1993.— 118 (1).— P. 45–58.



ProfiBlot 48

Надежность результатов,
проверенная временем

TECAN.



ООО «ТДА-Восток», дистрибьютор TECAN на территории России и СНГ
123308, Москва, Хорошевское шоссе, д. 43 Г
Тел.: +7 (495) 380-36-61, info@tda-vostok.ru, www.tda-vostok.ru



Результаты клинико-лабораторных испытаний иммунофлуоресцентной тест-системы для ранней диагностики гриппа и других ОРВИ

И. В. Амосова

И. В. Амосова, к.б.н., вед. научный сотрудник¹

Е. В. Сорокин, с.н.с. ¹

Т. Р. Царева, с.н.с. ¹

В. Г. Майорова, с.н.с. ¹

Е. В. Кузнецова, к.б. н., с.н.с. ¹

М. В. Сверлова, научный сотрудник¹

А. А. Соминина, д.м.н., проф., зав. лабораторией¹

В. Ф. Суховецкая, к.м.н., с.н.с. ²

В. С. Афанасьева, м.н.с. ²

¹Лаборатория биотехнологии диагностических препаратов,

²отделение респираторных вирусных инфекций у детей

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» (НИИ гриппа) Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Results of laboratory testing of immunofluorescence test system for early detection of influenza and other acute respiratory viral infections in hospital condition

I. V. Amosova, E. V. Sorokin, T. R. Tsareva, V. G. Mayorova, E. V. Kuznetsova, M. V. Sverlova,

V. F. Sukhovetskaya, V. S. Afanasyeva, A. A. Sominina

The Scientific and Research Institute for Influenza, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Разработана тест-система для непрямого иммунофлуоресцентного анализа с использованием моноклональных антител к вирусам гриппа А, В, респираторно-синцитиального вируса, аденовирусам и вирусам парагриппа II и III типов, а также ФИТЦ-конъюгата антител к IgG мыши. Тест-система апробирована на клинических материалах от 153 больных детей, госпитализированных по поводу гриппа и других ОРВИ по выявлению вирусных антигенов в клетках назофарингеального эпителия. Чувствительность и специфичность тест-системы варьировала в пределах 79,4–100% и 97,9–100% соответственно, что определяет целесообразность ее дальнейших клинических испытаний и последующего внедрения в практику здравоохранения.

Ключевые слова: метод флуоресцирующих антител, моноклональные антитела, респираторные вирусы.

Summary

A new kit for indirect immunofluorescence assay based on inclusion in its composition of monoclonal antibodies to influenza A, B, respiratory syncytial virus, adenovirus and parainfluenza viruses types II and III as well as the FITC conjugate to mouse IgG was developed. The kit was tested on the clinical materials of 153 children hospitalized with influenza and other acute respiratory viral infections by detection of viral antigens in the cells of nasopharyngeal epithelium. The sensitivity of the kit in detection of different respiratory agents varied in the ranges 79.4–100% and specificity in 97.9–100% that determines advisability its further clinical trials and subsequent implementation in public health practice.

Key words: immunofluorescence, monoclonal antibodies, respiratory viruses.

Использование современных наборов для иммунофлуоресцентного анализа позволяет провести определение широкого спектра возбудителей в материале от больного в течение часа [1]. Метод флуоресцирующих антител (МФА) для определения вирусных антигенов отличается простотой, скоростью, низкой стоимостью и не уступает по чувствительности и специфичности современным вариантам иммуноферментного анализа

(ИФА) [2] и наиболее эффективен в острой фазе (первые три дня) заболевания. Его результативность существенно зависит от правильности получения клинических материалов, скорости и условий доставки в лабораторию, а также качества используемых реагентов [3, 4]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует использовать для идентификации возбудителей острых респираторных вирусных инфекций МФА наряду

с выделением вирусов в культуре клеток или полимеразной цепной реакцией (ПЦР) [5].

В лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» были получены панели разнонаправленных моноклональных антител (МКА) к ряду возбудителей гриппа и других ОРВИ. Для конструирования диагностической тест-системы по показателям специфической активности в непрямом МФА (Н-МФА) были отобраны наи-

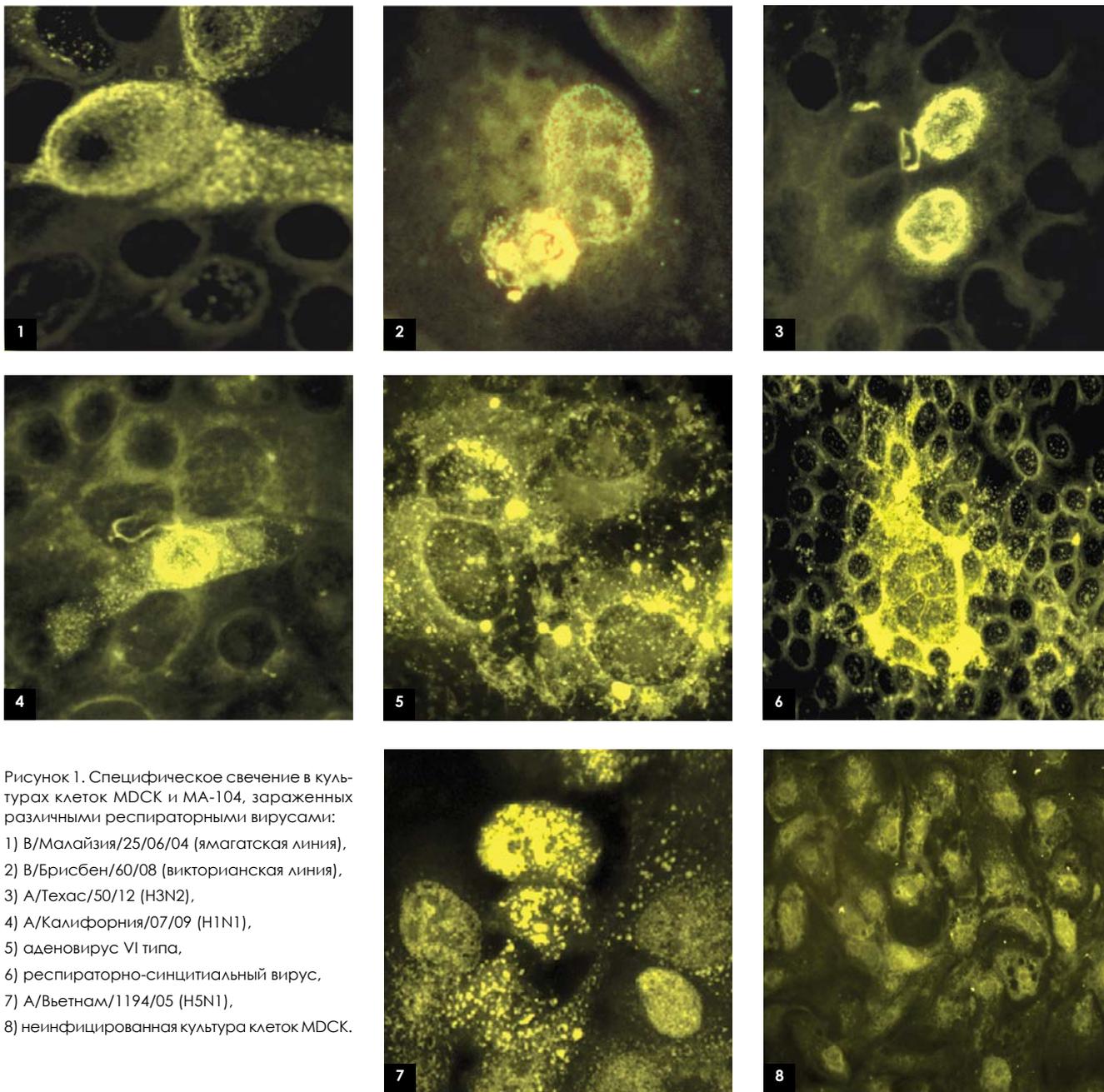


Рисунок 1. Специфическое свечение в культурах клеток MDCK и MA-104, зараженных различными респираторными вирусами:

- 1) В/Малайзия/25/06/04 (ямагатская линия),
- 2) В/Брисбен/60/08 (викторианская линия),
- 3) А/Техас/50/12 (H3N2),
- 4) А/Калифорния/07/09 (H1N1),
- 5) аденовирус VI типа,
- 6) респираторно-синцитиальный вирус,
- 7) А/Вьетнам/1194/05 (H5N1),
- 8) неинфицированная культура клеток MDCK.

Примечание: для культивирования вирусов гриппа использовали культуру клеток MDCK; через 24 часа после инфицирования препараты фиксировали, и проводили окраску по непрямому методу иммунофлуоресценции. Для культивирования адено- и РС-вирусов использовали культуру клеток MA-104. Препараты фиксировали через 48 часов после заражения. Увеличение $\times 1000$.

более активные клоны, титр которых в Н-МФА составил 10^{-3} . Отобранные МКА не обладали перекрестной реактивностью с гетерологичными возбудителями ОРВИ и антигенами клеток хозяина (рис. 1).

С учетом характеристик избранных МКА была сформирована иммунофлуоресцентная (ИФЛ) тест-система для обнаружения антигенов вирусов гриппа А, В, РС-вируса, аденовирусов, вирусов парагриппа II

и III типов в материалах от больных ОРВИ, а также для обнаружения вирусных антигенов в препаратах инфицированных клеточных культур. Наибольшую трудность при люминесцентной микроскопии мазков от больных гриппом и ОРВИ представляет дифференциация специфически светящихся клеток от флуоресцирующих неспецифически. Использование МКА значительно облегчало интерпретацию

результатов МФА за счет более яркой специфической флуоресценции и полного отсутствия фоновых реакций (рис. 2).

По результатам клинико-лабораторных испытаний показатели чувствительности ИФЛ тест-системы варьировали в пределах 79,4–100%, а специфичности 97,9–100% при выявлении различных антигенов респираторных вирусов (табл. 1). Относительно невысокие показате-

Таблица 1
 Диагностические показатели эффективности ИФЛ тест-системы

Показатели	Результаты клинической апробации тест-системы при диагностике, %					
	Грипп А	Грипп В	Аденовирусная инфекция	РС-вирусная инфекция	Парагрипп	
					II тип	III тип
Чувствительность	81,8	80	80	79,4	100	100
Специфичность	97,9	100	99,2	98,4	98,4	100
Позитивное предсказание	75	100	94,1	93,1	66,7	100
Негативное предсказание	98,6	99,3	97	95,1	100	100
Общее совпадение результатов	96,7	99,3	96,7	94,1	98,4	100

тели чувствительности могут быть объяснены как субъективизмом анализа и качеством исследуемых мазков, так и небольшим объемом исследования. Однако сам принцип оценки показателей эффективности нового метода основан на том, что показатели эффективности метода сравнения (в данном случае поликлональные ФИТЦ-конъюгаты) принимаются за 100%, и в случае большей чувствительности нового метода он теряет в оценке специфичности. Кроме того, возможные ошибки метода сравнения влияют на показатель чувствительности нового метода. Вместе с тем следует отметить

достаточно высокие (96,7–100%) показатели совпадения результатов при использовании новой ИФЛ тест-системы и зарекомендовавших себя на российском рынке «Иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих» производства ООО «ППДП» при НИИ гриппа.

Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать разработанную ИФЛ тест-систему для ранней диагностики гриппа и других ОРВИ для дальнейших расширенных клинико-лабораторных испытаний в целях ее последующего внедрения в практику здравоохранения.

Список литературы

1. Kuypers J. Comparison of Real-Time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infections in Children. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 2382–8.
2. Spencer K.— A. Recombinant viral proteins for use in diagnostic ELISAs to detect virus infection. *Vaccine.* 2007; 25: 5653–9.
3. Gavin P. J. Review of rapid diagnostic tests for influenza. *Clinical and applied immunology reviews.* 2003; 4: 151–72.
4. Соминина А. А., Милькинт К. К., Амосова И. В. Быстрая диагностика гриппа и других ОРВИ иммунофлуоресцентным методом: методические рекомендации. — СПб: ГУ «НИИ гриппа» РАМН; 2006.
5. WHO Global influenza surveillance Network. *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.* Geneva: World Health Organization; 2011. 139 p.

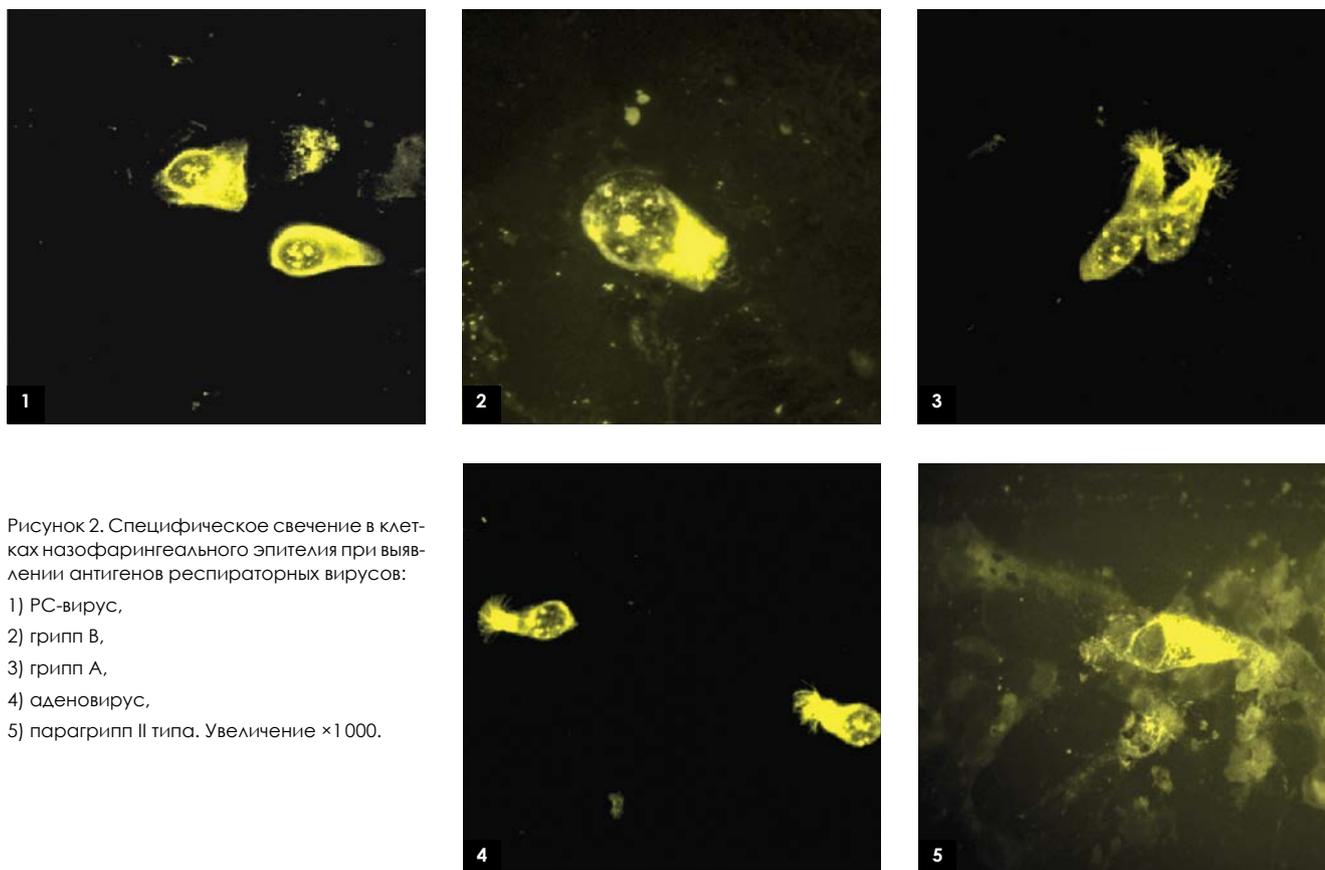


Рисунок 2. Специфическое свечение в клетках назофарингеального эпителия при выявлении антигенов респираторных вирусов:

- 1) РС-вирус,
- 2) грипп В,
- 3) грипп А,
- 4) аденовирус,
- 5) парагрипп II типа. Увеличение ×1000.



ппдп

Предприятие по производству
диагностических препаратов

Своевременная и быстрая лабораторная диагностика позволяет расширить возможности в лечении и профилактике вирусных инфекций. Применение высокоспецифичных противовирусных препаратов, использование иммуномодуляторов и вакцин, а также организация своевременных противоэпидемических мероприятий невозможны без определения возбудителя заболевания.

Для обеспечения лабораторного надзора за гриппом и ОРВИ на территории России и стран СНГ ООО «ППДП» выпускает широкий спектр современных эффективных препаратов для диагностики гриппа и других ОРВИ, включая:

- иммуноглобулины флуоресцирующие для выявления вирусного антигена в клинических материалах
- иммуноферментные тест-системы для определения вирусных антигенов и прироста антител в сыворотках реконвалесцентов
- диагностикумы и сыворотки диагностические для определения антител и идентификации вирусов в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции нейтрализации
- моноклональные антитела для иммунодиагностических исследований



www.pppd-spb.com

Тел: +7 (812) 499-15-72 Email: ppdp@influenza.spb.ru



Федеральное государственное бюджетное учреждение
Научно-исследовательский институт ГРИППА
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*Совместно с ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

РОССИЙСКАЯ НЕДЕЛЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

7–11 декабря 2015



ЗА ЗДОРОВУЮ ЖИЗНЬ

Международный форум по профилактике неинфекционных заболеваний и формированию здорового образа жизни



ЗДРАВООХРАНЕНИЕ

25-я международная выставка «Здравоохранение, медицинская техника и лекарственные препараты»



ЗДОРОВЫЙ ОБРАЗ ЖИЗНИ

9-я международная выставка «Средства реабилитации и профилактики, эстетическая медицина, оздоровительные технологии и товары для здорового образа жизни»



 **ЭКСПОЦЕНТР**
МОСКВА

123100, Россия, Москва,
Краснопресненская наб., 14
Единый справочно-
информационный центр:
8 (499) 795-37-99
E-mail: centr@expocentr.ru
www.expocentr.ru,
экспоцентр.рф

Организаторы:

- Государственная Дума ФС РФ
- Министерство здравоохранения РФ
- ЦВК «Экспоцентр»

При поддержке:

- Совета Федерации ФС РФ
- Министерства промышленности и торговли РФ
- Российской академии наук
- Торгово-промышленной палаты РФ
- Всемирной организации здравоохранения в РФ

12+ реклама

Трехкомпонентный кардиотест «ИммунТех»

**Быстрая и точная диагностика
инфаркта миокарда!**

- **Высокая диагностическая ценность исследования**

Одновременное определение трех маркеров инфаркта миокарда (тропонина I, миоглобина и креатинкиназы MB)

- **Быстрота получения результата**

Время от взятия крови до получения результата - 15 минут

- **Простота и удобство в использовании**

Для выполнения анализа дополнительное оборудование не требуется



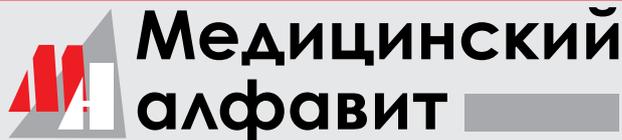
**Используют в работе
более 800 ЛПУ
по всей России!**

**«ИммунТех» - бесприборное определение
3-х маркеров инфаркта миокарда
в течение 15 минут!**



А/О Юнимед, 129301, г. Москва, ул. Касаткина, 3а
тел.: (495) 734-91-31, факс (495) 229-91-31
e-mail: office@unimedao.ru
www.unimedao.ru

БЛАНК-ЗАКАЗ на подписку на журнал 2015 год



Название организации (или Ф.И.О.) _____

Адрес (с почтовым индексом) _____

Телефон: _____ E-mail: _____ Контактное лицо: _____

- «Медицинский алфавит. **Стоматология**» — 4 выпуска в год (1 200 руб.)
- «Медицинский алфавит. **Современная лаборатория**» — 4 выпуска в год (1 200 руб. в год)
- «Медицинский алфавит. **Эпидемиология и гигиена**» — 4 выпуска в год (1 200 руб. в год)
- «Медицинский алфавит. **Больница — все для ЛПУ**» — 4 выпуска в год (1 200 руб. в год)
- «Медицинский алфавит. **Неотложная медицина**» — 4 выпуска в год (1 200 руб. в год)
- «Медицинский алфавит. **Диагностика и онкотерапия**» — 2 выпуска в год (600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит. **Фармакотерапия**» — 2 выпуска в год (600 руб в год)
- «Медицинский алфавит. **Кардиология**» — 4 выпуска в год (1 200 руб в год)
- «Медицинский алфавит. **Гастроэнтерология**» — 2 выпуска в год (600 руб в год)
- «Медицинский алфавит. **Неврология и психиатрия**» — 2 выпуска в год (600 руб в год)

Наш индекс в каталоге
«РОСПЕЧАТЬ» 36228

НДС — 0%

Извещение	ООО «Альфмед» (наименование получателя платежа) 7716213348 (ИНН получателя платежа) Рс № 40702810738090108773 (номер счета получателя платежа) в Московский Банк Сбербанка России (наименование банка и банковские реквизиты) ОАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. МОСКВА К/с 30101810400000000225 БИК 044525225
	Годовая подписка на журнал «Медицинский алфавит. _____» на 2015 год (наименование платежа) Дата _____ Сумма платежа _____ Плательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____
Квитанция	ООО «Альфмед» (наименование получателя платежа) 7716213348 (ИНН получателя платежа) Рс № 40702810738090108773 (номер счета получателя платежа) в Московский Банк Сбербанка России (наименование банка и банковские реквизиты) ОАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. МОСКВА К/с 30101810400000000225 БИК 044525225
	Годовая подписка на журнал «Медицинский алфавит. _____» на 2015 год (наименование платежа) Дата _____ Сумма платежа _____ Плательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____
Кассир	
Кассир	

Как подписаться

1. Заполнить прилагаемый бланк-заказ и квитанцию об оплате. 2. Оплатить квитанцию.
3. Отправить бланк-заказ и квитанцию (или их копии) по почте по адресу: 129344, Москва, ул. Верхоянская, д.18 к. 2; или по факсу: (495) 616-48-00, 221-76-48, или по e-mail: medalfavit@mail.ru



LAMSYSTEMS

www.lamsys.ru

Единственный Российский с сертификатом TÜV

БОКС МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
Класс II Тип А2 БМБ-II-“Ламинар-С”-1,2 Код: 221.120



Сертификат № 44 330 13085601

Neoteric

Масштабная модель бокса 1:5

ЗАО “ЛАМИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ”

Россия, 456300, Челябинская обл., г. Миасс, Тургорякское шоссе, 2/4

Телефон/факс: (3513) 255-255

sale@lamsys.ru www.lamsys.ru

Представитель в Москве: тел./факс: 8 (925) 508-71-26, 8 (901) 547-84-03

МЕСТО, ГДЕ СПЕЦИАЛИСТ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВСТРЕЧАЕТСЯ С РЕШЕНИЕМ СВОИХ ЗАДАЧ

Компания

INNOVASYSTEM

Лабораторная
Информационная
Медицинская
Система
(ЛИМС)

- 🌐 www.innovasystem.pro
- ☎ +7 (495) 984-96-74
- ✉ E-mail: info@innovasystem.pro

121170, Москва, Кутузовский пр-т, д. 36, стр. 3, офис 102

