

Серии научно-практических рецензируемых журналов



Медицинский алфавит

19 (282) 2016



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

Уважаемые читатели!

В этом номере мы публикуем тезисы, подготовленные для юбилейного XX Форума «Национальные дни лабораторной медицины России — 2016». Это событие пройдет с 14 по 16 сентября в г. Москве в спортивном комплексе «Олимпийский». Форум проводится при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации и Российской академии наук и посвящается памяти профессора В. В. Меньшикова, который на протяжении 18 лет был бессменным организатором и вдохновителем форума.

Организаторы форума: Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, институт повышения квалификации ФМБА России, Ассоциация производителей средств клинической лабораторной диагностики, Научно-практическое общество специалистов лабораторной медицины, Российская Ассоциация медицинской лабораторной диагностики, Национальная ассоциация лабораторной, персонализированной и трансляционной медицины при участии Российского научного общества иммунологов, Научного общества нефрологов России, Национального научного общества инфекционистов, Научного общества «Клиническая гемостазиология», Национальной академии микологии.

В программе форума:

- общероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Консолидация лабораторной медицины и клинической практики: диагностические инновации, лабораторная индустрия»;
- специализированная выставка «Интерлабдиагностика-2016»;
- образовательные программы института повышения квалификации ФМБА России для биологов и врачей всех специальностей.

Форум «Национальные дни лабораторной медицины России» проводится с 1997 года и ежегодно собирает на своей площадке до 3 тысяч специалистов в области лабораторной медицины и клинических дисциплин из России и зарубежья.

Научная программа юбилейного форума сформирована при активном участии региональных специалистов: из 225 докладов более 80 включены в программу по инициативным заявкам из 23 регионов России и четырех зарубежных стран. Она включает обсуждение традиционных вопросов деятельности диагностических лабораторий в тесной взаимосвязи с актуальными потребностями современной клинической практики. При формировании программы акценты сделаны на практическом применении принципов доказательной и персонализированной медицины, внедрении инновационных медицинских технологий и дальнейшем развитии лабораторной медицины с учетом более глубокого



понимания междисциплинарных отношений. Особое внимание уделено вопросам организации работы медицинских лабораторий, взаимодействию с клиницистами в определении алгоритмов диагностики, интерпретации результатов и тактики лечения.

Официальный партнер форума: компания «Хай-Медиа Лабораториз». Спонсор научной программы: «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М. П. Чумакова» РАН. Эксклюзивные медиа-партнеры: «Интернет-сессия» (портал internist.ru) и журнал «Медицинский алфавит».

В работе форума заявили участие ведущие специалисты клиничко-диагностических и микробиологических лабораторий, врачи клинических специальностей, руководители медицинских организаций, сотрудники научных и образовательных организаций, разработчики и производители технологий, оборудования и средств лабораторного анализа.

Все материалы этого номера прошли рецензирование и будут размещены в *Научной электронной библиотеке Elibrary* и проиндексированы базой данных научного цитирования РИНЦ. Журнал, как обычно, будет распространяться на всех профильных мероприятиях, по подписке, подписке онлайн и по системе продвижения журнала.

Надеемся, что представленные в этом номере работы будут вам интересны.

В дальнейшем мы планируем продолжить публикации научных статей и тезисов. Приглашаем к сотрудничеству!

С. Н. Щербо, главный редактор журнала «Современная лаборатория» серии «Медицинский алфавит», президент Национальной ассоциации лабораторной, персонализированной и трансляционной медицины.

Редакционная коллегия

Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Kosyrev A. B., PhD, associate professor, al Academy of Postgraduate Education, Mediоlab, Moscow

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

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

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

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

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 (КАМЛА), г. Алматы, Казахстан

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Современная лаборатория Том №3

Медицинский алфавит

Серия журналов для специалистов

№ 19 (282) 2016

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. Синица

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. Шестопалов, 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.

Подписан в печать 5 сентября 2016 года.

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

СОДЕРЖАНИЕ

I. Персонализированная и трансляционная медицина, организация и централизация лабораторных исследований

- 13 Опыт проведения межлабораторных сравнительных испытаний в медицинских лабораториях ЮКО
Т. Ю. Бекетова, С. Т. Ускеленова
- 14 Качество интерпретации лабораторных исследований врачами-терапевтами
Л. П. Ефимова
- 15 Трансляционная офтальмология: российский опыт
М. Е. Иванова, И. В. Зольникова, В. В. Стрельников
- 15 Роль биобанкирования в биомедицинских исследованиях — от фундаментальной науки в клиническую практику
М. В. Пузанов, Л. Л. Гиришова, Ю. В. Миролюбова
- 16 О результатах отбраковки биопроб крови на преналитическом этапе лабораторного исследования в централизованной клинико-диагностической лаборатории
С. Н. Суплютов, Н. А. Сорокина, И. В. Пашикина
- 17 Медицина «5 П» и научные платформы Министерства здравоохранения РФ — основа новой национальной системы здравоохранения России
С. Н. Щербо, М. И. Савина, В. А. Беспалова, Д. С. Щербо

II. Персонализированная лекарственная терапия, фармакогенетика и фармакогеномика

- 17 Персонализированный подход к лечению миомы матки
Л. Х. Бехбудова, Е. Н. Карева, О. С. Горенкова, Т. Е. Самойлова
- 19 Исследование влияния полиена и омакора на активность показателей антиоксидантной системы крови больных псориазом в опытах *in vitro*
Л. Б. Гайковая, Р. Н. Павлова, Ч. Р. Бейшебаева, М. Н. Смертина, Ж. В. Антонова, Л. А. Карякина, Н. В. Тюнина, А. И. Ермаков
- 20 Подходы к персонализированной коррекции нарушений микроэкологии кишечника на основе оптимизации состава пробиотических препаратов по их метаболическим профилям
А. М. Затевалов, А. Ю. Миронов, Е. П. Селькова, Е. О. Рубальский, Н. В. Гудова, Е. А. Затевалова
- 20 Молекулярно-фармакологический маркер прогноза противорецидивного действия диеногеста у пациенток с эндометриозом яичников
Е. Н. Карева, Н. А. Коцюбинская, Л. С. Булатова
- 21 Персонализированный подход в лечении стероидрезистентных форм истинной акантолитической пузырчатки
А. А. Лепехова, А. С. Духанин, Н. П. Теплюк, Н. Л. Шимановский

III. Предиктивная медицина. Лабораторные биомаркеры ревматологических и аутоиммунных заболеваний

- 22 Предиктивное значение молекулярных и клеточных биомаркеров при системных аутоиммунных заболеваниях
Е. Н. Александрова

- 23 Роль мультиплексного иммунного анализа антиядерных антител в диагностике, оценке активности и характера течения системной красной волчанки
Ж. Г. Верижникова, Е. Н. Александрова, А. А. Новиков, Т. А. Панафидина, Н. В. Середавкина, Т. В. Попкова, Н. Л. Айзина, Е. Л. Насонов
- 24 Взаимосвязь генетических маркеров и клинических фенотипов при ревматоидном артрите
И. А. Гусева, Н. Е. Сорока, Н. В. Демидова, Е. Л. Лучихина, Е. Н. Александрова, А. А. Новиков, Е. Ю. Самаркина, Е. В. Федоренко, Д. Ю. Трофимов, Д. Е. Каратеев, Е. Л. Насонов¹
- 25 Опыт использования электрокинетических показателей лимфоцитов в качестве диагностических критериев
М. Р. Насыров, В. Б. Метелин, Т. И. Якушина
- 25 Лабораторные предикторы ответа на терапию иммуновоспалительных заболеваний
А. А. Новиков
- 26 Сравнение цитокиновых профилей при системной красной волчанке и ревматоидном артрите
А. А. Новиков, Е. Н. Александрова, Ж. Г. Верижникова, Т. В. Попкова, Т. А. Панафидина, Д. Е. Каратеев
- 26 Возможности культурального метода в диагностике и прогнозировании аутоиммунных вариантов сахарного диабета
Е. А. Ретина
- 27 Корреляция высокого уровня двойных негативных В-лимфоцитов периферической крови с активностью системной красной волчанки
Е. В. Супоницкая, А. П. Алексанкин, А. А. Меснянкина, Т. А. Панафидина, С. К. Соловьев, Е. Н. Александрова, Е. Л. Насонов
- 28 Операционные характеристики различных методов определения аутоантител к антигенам островковых клеток
А. В. Тимофеев
- 29 Экспрессия генов в крови перед началом лечения как прогностический маркер эффективности антиревматической терапии у больных ревматоидным артритом
Е. В. Четина, Г. А. Маркова, Н. В. Демидова, А. В. Пиванова

IV. Молекулярно-биологическая диагностика и выбор таргетной терапии онкологических заболеваний

- 30 Роль онкомаркеров в дифференциальной диагностике кистозных опухолей печени
В. С. Демидова, П. В. Усякий, А. Ш. Кучейник, В. А. Вишневский
- 31 Тимидинфосфорилаза — перспективный маркер эпителиально-мезенхимальной трансформации опухоли
Е. М. Бакурова, Б. Г. Борзенко, И. В. Василенко
- 32 Особенности выявления протенирии у больных mielomой Бенс-Джонса
Н. В. Инюткина
- 33 Возможности применения клеточных биочипов для диагностики онкогематологических заболеваний
С. А. Кузнецова, А. Н. Хвастунова, О. С. Федянина, А. О. Закирова, А. Е. Задорожная, Ф. И. Атауллаханов

34 Молекулярная диагностика онкогематологических заболеваний

*А. В. Мисюрин, В. А. Мисюрин, А. А. Крутов,
Ю. П. Финашутина, В. В. Тихонова, Л. А. Кесаева,
И. Н. Солдатова, Е. Н. Мисюрина, А. С. Мкртчян,
С. С. Маркова, К. С. Кайсина, М. В. Телков,
С. С. Зборовский*

35 Диагностика рака предстательной железы

*Н. С. Теврюкова, В. Н. Богатырев, В. Н. Нидюлин,
С. С. Голубев*

35 Молекулярно-генетические факторы в выборе тактики лечения злокачественных новообразований

Н. Е. Торопова, Е. В. Закамова, А. Е. Орлов

37 Иммунофенотипическая характеристика субклона циркулирующих опухолевых плазматических клеток при множественной миеломе

*Ю. Ю. Чуксина, К. А. Белоусов, С. В. Шевелев,
В. В. Яздовский, А. К. Голенков*

V. Современная лабораторная диагностика инфекционных заболеваний

38 Применение иммунного блоттинга в диагностике цитомегаловирусной инфекции

А. С. Авдонина

39 Андрофлор® — новый метод диагностики

*заболеваний урогенитального тракта мужчин
М. Н. Болдырева, И. С. Галкина*

40 Новые возможности диагностики пневмоний: быстрые антигенные тесты для этиологической расшифровки возбудителей

А. Е. Дробченко, О. Марсолин

41 Частота выявления гепатитов среди беременных женщин, обследованных на TORCH-инфекции

А. А. Ганина, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов

41 Использование метода ПЦР в диагностике инфекционного мононуклеоза

Н. И. Королева, О. В. Андриенко, Е. Н. Маленьких

42 Универсальный аппаратно-программный комплекс «Эксперт-Лаб» для регистрации и интерпретации результатов диагностических лабораторных исследований

*Н. В. Мажукин, С. Г. Марданлы, А. Е. Туголуков,
С. В. Ротанов*

42 Зоонозные инфекции в современном обществе. Скрытые угрозы

В. А. Малов, Е. Я. Малова

43 Применение линейного иммуноблоттинга для лабораторной диагностики инфекций TORCH-группы

С. С. Марданлы, В. А. Арсеньева, Е. А. Амелина

43 Прогностические параметры при формировании длительно протекающей урогенитальной гонореи

Е. А. Михайлова, А. Ю. Миронов, О. О. Жеребятёва

44 Диагностическая значимость неопределённых результатов исследования антител к вирусу гепатита С

*А. А. Потапова, Т. А. Туполева, Е. Н. Овчинникова,
М. М. Шульгина, М. И. Ермолаева, Е. В. Ефремова,
Н. И. Сюч*

45 Модификация выпуска кардиолипидного антигена для диагностики сифилиса

*С. В. Ротанов, С. Г. Марданлы, Е. А. Амелина,
Н. В. Бахилина, И. А. Ермолаева*

46 Лабораторная диагностика персистирующей инфекции в крови ex tempore

Н. И. Цирельников

VI. Клиническая микробиология и антибиотикорезистентность

47 Технология ускоренного культурального определения лекарственной чувствительности клинических изолятов микобактерий туберкулеза на основе применения микобактериофагов с количественным анализом фаговой ДНК

*М. А. Владимировский, Н. С. Смирнова, М. Б. Лапенкова,
Л. К. Шипина*

48 Инфекции, вызванные мульти- и пан-резистентными микроорганизмами в онкологической клинике

*Н. В. Дмитриева, З. В. Григорьевская, Н. С. Багирова,
И. Н. Петухова, И. В. Терещенко, И. И. Шильникова,
Е. В. Кулага, Т. А. Калинчук*

49 Альтернативная оценка постгенетического риска патогенности групп клинических штаммов стафилококков, различающихся резистентностью к антибиотикам и способностью к образованию биопленок

*В. М. Лахтин, А. Л. Байракова, М. В. Лахтин,
С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин*

50 Мультиплексный генетический анализ детерминант антибиотикорезистентности возбудителей инфекций, приводящих к нарушению репродуктивных функций

*А. Т. Лейнсоо, Е. А. Дементьева, Б. Л. Шаскольский,
А. В. Честков, В. С. Соломка, Д. Г. Дерябин, А. А. Кубанов,
Д. А. Грядунов*

51 Кровь баранья дефибрированная для приготовления питательных сред

С. Г. Марданлы, Н. В. Бахилина, С. В. Ротанов, М. А. Котляр

51 Мониторинг микробиоценоза миндалин студентов, больных хроническим тонзиллитом

*Е. А. Михайлова, А. Ю. Миронов, С. Б. Киргизова,
О. О. Жеребятёва, Т. О. Федорова, Д. Р. Сафарова,
Л. М. Азнабаева, М. В. Фомина*

52 Состояние микробиоценоза и антибиотикорезистентность Enterobacteriaceae в тканях пародонта при пародонтите и периодонтите

*В. П. Мудров, М. В. Стамм, М. С. Мяндиев,
И. С. Фоменков, В. Н. Нелюбин, Г. И. Макаренко,
Т. В. Черненко, Д. А. Шмаров*

52 Выявление антибиотикорезистентности микроорганизмов при бактериально-вирусном инфицировании слизистой оболочки желудочно-кишечного и урогенитального тракта

*В. П. Мудров, И. С. Фоменков, М. С. Мяндиев,
В. Н. Нелюбин, М. В. Стамм, С. Г. Утенкова, О. А. Милов,
Г. И. Макаренко, Т. В. Черненко, Д. А. Шмаров*

53 Антимикробная терапия грамположительных инфекций

*И. Н. Петухова, Н. В. Дмитриева, Н. С. Багирова,
З. В. Григорьевская, И. И. Шильникова, И. В. Терещенко*

54 Антагонистические особенности штаммов синегнойной палочки, выделенных при гнойно-воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта

*Т. О. Федорова, Е. А. Михайлова, С. Б. Киргизова,
О. О. Жеребятёва, Г. О. Махалова, Н. Ю. Кацук,
Д. Г. Укубаева*

VII. Современные лабораторно-диагностические маркеры в оценке патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний

54 Гипергомоцистемия — независимый предиктор кардиоваскулярных осложнений у больных сахарным диабетом типа 2

А. Г. Денисова, Е. Р. Кулюцина, Т. А. Дружинина

- 55 Костный обмен при хронической сердечной недостаточности
В. Н. Ларина, И. И. Чукаева, Д. Г. Карпенко, Т. Н. Распопова
- 55 Лабораторная диагностика митохондриальной дисфункции и лечение препаратами кофермента Q₁₀
Л. Г. Мишура, Г. Г. Родионов
- 56 Анализ экспрессии маркеров фиброза миокарда в мезенхимных стромальных клетках костного мозга после острого ишемического воздействия
М. В. Пузанов, Р. И. Дмитриева, А. А. Карпов, О. В. Сироткина

VIII. Проблемы гемостаза, тромбоза и гемореологии в клинической практике

- 57 Оценка коагуляционной активности на фоне профилактики дабигатраном после крупных ортопедических операций: рутинные тесты, молекулярные маркеры, тромбоэластография
И. П. Антропова
- 58 Васкулоэндотелиальный фактора роста, фактора роста фибробластов и трансформирующий фактор роста $\beta 1$ в прогнозе рестенозов коронарных артерий у пациентов, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам
Е. Ю. Васильева
- 59 Связь генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушением метаболизма фолатов и риском тромбофилии с уровнем гомоцистемина у беременных с хронической болезнью почек
И. О. Жегулина, С. Г. Жегулина, М. И. Сидоркина, И. Г. Никольская, Т. С. Бубыкина
- 60 Референсные интервалы лабораторных тестов коагуляции в динамике физиологической беременности и их клиническое использование
Т. Ю. Иванец, М. А. Виноградова, Н. В. Долгушина
- 61 Изменение гемостатических свойств тромбоцитов при хранении тромбоцитных концентратов
И. М. Колесникова, Е. В. Ройтман, О. В. Карпова, С. А. Румянцев
- 62 Различия лабораторных показателей реактивности тромбоцитов по результатам тестов ARU VerifyNow для различных форм АСК у пациентов с ИБС после коронарного стентирования
А. Д. Котвицкий, И. В. Периуков, С. В. Остащенко, Т. Н. Кузнецова, А. А. Омаров, Джафар Мамед-оглы Рамазанов, З. А. Карбен, С. Н. Щербо, Т. А. Батыралиев, Б. А. Сидоренко
- 62 Роль остаточной реактивности тромбоцитов в развитии кровотечений после коронарного стентирования
А. Д. Котвицкий, И. В. Периуков, С. В. Остащенко, Т. Н. Кузнецова, А. А. Омаров, Джафар Мамед-оглы Рамазанов, З. А. Карбен, С. Н. Щербо, Т. А. Батыралиев, Б. А. Сидоренко
- 63 Медикаментозная терапия кровотечений и тромбозов: новые достижения и новые проблемы
Е. В. Ройтман
- 64 Влияние гемореологических аспектов при формировании состояния тромбоцитической готовности на фоне некоторых онкогематологических заболеваний
Е. В. Ройтман, И. М. Колесникова, И. Л. Давыдкин, Н. С. Козлова, М. А. Марков
- 65 Глобальные тесты гемостаза в оценке эффективности антикоагулянтной терапии у беременных с острым нарушением мозгового кровообращения
М. И. Сидоркина, К. Н. Ахведиани, Л. С. Логутова, А. А. Травкина, Т. А. Вуймо, Т. С. Будыкина

IX. Клиническая лабораторная диагностика в акушерстве и гинекологии

- 66 Роль дисбаланса сосудистых (ангиогенных) факторов роста в патофизиологии преэклампсии и плацентарной недостаточности
Л. С. Джохадзе, О. В. Макаров, Ю. Э. Доброхотова
- 67 Изучение эффективности и безопасности применения препарата диногест (Визанна) в лечении эндометриоза
Ю. Э. Доброхотова, И. И. Гришин, И. Ю. Ильина, Д. М. Ибрагимова, Д. М. Калиматова
- 67 Скрининг показателей тиреоидного статуса в комплексном обследовании беременных с угрозой невынашивания
Ю. Э. Доброхотова, И. В. Бахарева
- 68 Ранняя диагностика доклинических форм генитального пролапса у женщин репродуктивного возраста
С. В. Камоева, О. В. Макаров, Х. А. Абеева, Ю. Э. Доброхотова
- 69 Особенности генов тромбофилии у пациенток с гиперпластическими процессами эндометрия
Л. А. Озолина, И. А. Лапина, Л. И. Патрушев, Т. Ф. Коваленко
- 70 Полиморфизм генов, контролирующих процессы эластогенеза, у женщин с пролапсом тазовых органов
М. Б. Хаджиева, О. В. Макаров, Ю. Э. Доброхотова, С. В. Камоева, С. К. Абилов, Л. Е. Сальникова

X. Современные лабораторные технологии в перинатологии и педиатрии

- 71 Лабораторная служба пренатальной диагностики в России. Комбинированный скрининг хромосомных аномалий и врожденных пороков развития у плода в I триместре беременности
Е. А. Калашникова, С. Н. Кокаровцева, Е. Ю. Воскобоева, А. С. Иванюк, Е. В. Судакова, А. И. Чепурная, С. Ю. Мамлеева
- 72 Оценка уровня оксида азота и серотонина в сыворотке крови детей с патологией верхнего отдела желудочно-кишечного тракта
К. В. Киреева, А. К. Мартусевич, Э. Н. Федулова
- 73 Лабораторная диагностика цитомегаловирусной инфекции у детей с использованием методов иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции
А. И. Пиянзин, Е. Н. Жукова, М. Р. Сапкина, О. В. Назаровская, Н. В. Шершинева
- 74 Ложно-положительные реакции на сифилис у детей с хроническими дерматозами
Н. В. Полякова, Н. К. Левчик, Н. В. Зильберберг
- 75 Возможности иммунодиагностики хронической крапивницы у детей с использованием проточной цитометрии
Н. А. Синельникова, Н. В. Бычкова, Н. М. Калинина, Н. Д. Савенкова
- 76 Возможность оценки состояния новорожденного после родов по клеточному составу пуповинной крови и крови матери
Д. А. Шмаров, А. К. Блбулян

XI. Лабораторные методы общеклинических исследований

- 77 **Импортозамещение в лабораторной медицине для неинвазивной диагностики предопухолевых заболеваний слизистой оболочки желудка**
О. Ю. Дорн, М. А. Шеховцова, С. А. Песков, Е. Г. Степанова, М. В. Паламарчук, Е. А. Цикаленко, Л. В. Вохминцева
- 78 **Оптимизация процесса производства порошка «ВАГИЛ-ШФ» на базе ТОО «Шаншаров-Фарм»**
Ж. Б. Бекболова, И. Абибуллаева, А. Орынбекова, А. Сабит, Б. А. Досжанова
- 79 **Опыт оценки жизнеспособности лейкоцитов в лейкоконcentратах, содержащих гемопоэтические стволовые клетки**
Н. В. Исаева, И. В. Парамонов, Н. В. Минаева, Г. А. Зайцева, Н. А. Зорина, Ф. С. Шерстнев, С. В. Утемов, А. А. Костяев, К. А. Ветошкин
- 80 **Опыт использования панели CytoDiff для скрининга пациентов с лимфоцитозами неясного генеза**
А. А. Калашикова, Т. Г. Цветкова
- 81 **Синдромом Гудпасчера, алгоритмы лабораторной диагностики**
С. П. Казаков, С. Б. Путков, Г. Н. Родкина, Р. А. Моруга, А. Г. Борисов
- 82 **Скрининг хронической болезни почек в амбулаторно-поликлинических учреждениях. Требования аналитического качества при исследовании мочи**
С. А. Картавенков, Л. Ф. Еремеева
- 83 **Метод определения функционального состояния митохондрий в организме у человека по показателям активности ферментов и микроскопического вида лимфоцитов крови на мазке (цитобioхимический метод)**
М. Н. Кондрашова, Н. В. Хундерякова, М. В. Захарченко, Т. В. Ячкула, С. А. Плясунова, В. С. Сухоруков, Н. И. Косякова, Е. Г. Литвинова, Н. И. Федотчева, П. М. Шварцбург
- 85 **Использование прямых маркеров фиброза печени в диагностике неалкогольной жировой болезни печени у военнослужащих контрактной службы**
Е. В. Крюков, С. П. Казаков, В. А. Семисерин, А. Г. Каракозов, О. Б. Левченко, А. И. Молодова, С. Ю. Леонова
- 86 **Сравнительная оценка слайд-планшетов и камеры Горяева при подсчете форменных элементов**
С. В. Кулешова, Л. О. Минушкина
- 87 **Взаимосвязь С-реактивного белка и гомоцистемии у здорового населения Пензенской области**
Е. Р. Кулюцина, Т. А. Дружинина, Е. В. Кривченкова
- 87 **Метод лабораторной диагностики хронического генерализованного пародонтита по элементному составу ротовой жидкости**
Т. К. Ларионова, А. Ш. Галикеева
- 88 **Универсальные молекулярные лектиновые системы эритропоэтинов человека: общие закономерности распознавания гликоконъюгатов белками**
В. М. Лахтин, М. В. Лахтин, В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев
- 89 **Взаимосвязь концентрации витамина D и уровня лютеинизирующего гормона (ЛГ) у лиц мужского пола г. Санкт-Петербурга и Ленинградской области**
Т. В. Лобачевская, Л. А. Хоровская, С. А. Печальнова
- 89 **Лабораторный мониторинг эффективности ранней метаболической реабилитации пациентов с ожогами**
А. К. Мартусевич, С. П. Перетягин, А. В. Разумовский, Л. К. Ковалева
- 91 **Новый набор extra-DNA позволяет выделить более качественную ДНК из FFPE-образцов, чем QIAamp DNA FFPE Tissue Kit**
В. А. Мисюрин, Л. А. Кесаева, Ю. П. Финашутина, В. В. Тихонова, Н. А. Лыжко, О. Н. Солопова, А. А. Крутов, Е. Н. Пушкова, И. Н. Солдатова, А. Е. Мисюрина, А. С. Мкртчян, А. А. Сальник, А. В. Мисюрин
- 91 **Изоформы трансформирующего ростового фактора, их биологическая активность и иммунопатология**
А. В. Москалев, А. С. Рудой
- 92 **Изменение лабораторных и клинических показателей после операций направленной тканевой регенерации на тканях пародонта**
Е. С. Родина, С. М. Киченко
- 93 **Интегральная оценка оксидативного статуса и детоксикационных систем крови в ранний период после термической травмы**
А. Г. Соловьева
- 94 **Диагностика состояния энергетического метаболизма крови при термической травме**
А. Г. Соловьева
- 95 **Оценка возможности использования методов «сухой химии» определения белка в моче как критерия для ожидания альбуминурии**
Е. Г. Степанова, О. Ю. Дорн, М. В. Паламарчук, Е. А. Цикаленко, Л. В. Вохминцева
- 96 **Состояние гемостаза, липидного и углеводного обмена при сочетании абдоминального ожирения с избыточной массой тела**
В. А. Сумеркина, Вл. С. Чулков
- 97 **Прогностическое значение определения содержания витамина D в сыворотке крови беременных с ожирением**
Н. А. Терехина, Е. Л. Макарова, М. М. Падруль
- 97 **Применение интегральных лейкоцитарных индексов при оценке степени токсического влияния химических факторов на организм работников химического производства**
Г. В. Тимашева, Э. Ф. Репина, А. Б. Бакиров, А. Ж. Гильманов, О. В. Валеева, А. З. Фагамова
- 99 **Опыт применения дублирующего оборудования для биохимического тестирования в условиях клиник-диагностической лаборатории на примере Architect с8000 и UniCell DxC 800 Synchron**
Л. А. Хоровская, Л. В. Котенко, Ю. П. Ковальчук
- 100 **Гликемический контроль в месте лечения: требования стандартизации и практика**
Л. А. Хоровская, Т. В. Лобачевская, О. В. Черничук
- 101 **Современные тренды оценки качества вакуумных пробирок для гематологических и коагулологических исследований в клинко-лабораторной практике учреждений здравоохранения**
Л. А. Хоровская, И. О. Шмидт



I. Персонализированная и трансляционная медицина, организация и централизация лабораторных исследований

Опыт проведения межлабораторных сравнительных испытаний в медицинских лабораториях ЮКО

Т. Ю. Бекетова, С. Т. Ускеленова

Experience of conducting proficiency test in medical laboratories of South Kazakhstan region

T. Yu. Beketova, S. T. Uskelenova

Введение. Критерием надежности аналитической работы диагностических лабораторий является проведение многоуровневого контроля качества проводимых исследований, состоящего из его двух взаимосвязанных форм: внутрилабораторного контроля качества (далее ВКК) и внешней оценки качества (далее ВОК). Сегодня на рынке Казахстана лидируют международные программы внешней оценки качества RIQAS (Великобритания) и Bio-Rad Laboratories (США). Программы охватывают большой диапазон исследуемых параметров, оптимизированы доставка проб и отправка результатов, отчеты своевременны, информативны, но... Цены весьма велики, и не каждая лаборатория может позволить себе участие в этих программах. Альтернативой международным программам могли бы послужить отечественные программы ВОК, но на данный момент они находятся на стадии разработки и организации. В реальных условиях важным моментом хорошей лабораторной практики может быть внутренний и межлабораторный контроль качества исследований биологических образцов. Межлабораторные сравнительные испытания (далее МЛСИ), как вид ВОК, рекомендованы приказом МЗСР РК № 758 от 28.09.2015. Однако проведение его на областных уровнях связано с определенными трудностями: отсутствием аккредитованного провайдера в регионе; отсутствием статьи расходов на приобретение контрольных материалов, стабильных по исследуемым анализам на протяжении проведения испытаний.

Цель: оценка качества производимых исследований лабораторий — участников МЛСИ.

Задачи: 1) найти альтернативу дорогостоящим стандартным контрольным материалам ВОК; 2) определить критерии для лаборатории, участвующей в роли референтной; 3) провести МЛСИ в Южно-Казахстанской области (площадью 117 249 км²).

Материалы и методы. Первая задача могла быть решена только использованием донорской крови с определением исследуемых параметров в референтной лаборатории. Наиболее сложным было найти решение сохранения стабильности этих параметров в течение двух суток — времени проведения МЛСИ. Были проведены предварительные эксперименты. Кровь четырех доноров была взята в одноразовые стерильные вакуумные пробирки AVATUBE для забора и хранения венозной крови: с К2 ЭДТА, объемом 2 мл и в одноразовые стерильные вакуумные пробирки AVATUBE для забора и хранения

венозной крови с гелем и активатором свертывания для разделения сыворотки объемом 5 мл. Исследовали цельную кровь по четырем параметрам: уровни гемоглобина, лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов на гематологическом анализаторе Sysmex KX-21N (наличие каждый день ВКК и ежемесячный ВОК RIQAS). В сыворотке на автоматическом биохимическом анализаторе Sapphire 400 (также наличие каждый день ВКК и ежемесячный ВОК RIQAS) определяли активность аланинаминотрансферазы, концентрации общего белка, общего билирубина, мочевины, триглицеридов. Исследования провели в день забора крови и последующих трех дней. Для проведения МЛСИ по онкоцитологии (исследование женского мазка на степень дисплазии) было решено использовать мазки из архива областного онкологического диспансера с установленной степенью дисплазии, подтвержденные цитологами областного консультативно-диагностического центра. Вторую задачу, ввиду отсутствия аккредитованного провайдера и для получения референтных значений наших контрольных материалов, решили принятием следующих критериев для референтных лабораторий: наличие в них многоуровневого контроля качества производимых исследований — внутреннего контроля и участия в международном контроле качества по программе клинической химии и гематологии. Были выбраны три лаборатории: областного консультативно-диагностического центра, областного реабилитационного центра «Мать и дитя», областной клинической больницы. Для решения третьей задачи были разработаны и утверждены в УЗ ЮКО следующие документы: стандартная операционная процедура «Межлабораторные сравнительные испытания и порядок их проведения», контрольная программа (инструкция) для участника МЛСИ, список референс-лабораторий и лабораторий — участников МЛСИ, график проведения этапов испытаний.

Результаты. Результаты предварительных испытаний стабильности исследуемых компонентов в одноразовых стерильных вакуумных пробирках AVATUBE для забора и хранения венозной крови дали неожиданные результаты: стабильность исследуемых компонентов сохранялась на протяжении четырех суток. Эти характеристики не были указаны заводом-изготовителем, но в проведении МЛСИ они имели решающую роль. Первые МЛСИ были проведены по клинической гематологии в 2015 г. Участвовали 46 лабораторий. В 2016 г. провели испытания по клинической химии, гематологии, онкоцитологии (исследование женского мазка на степень дисплазии). Участвовали 70 лабораторий. В первый день испытаний проводили забор крови у доноров в вышеуказанные вакуумные пробирки. В этот же день каждая лаборатория-участница получала согласно графику контрольные материалы: по одной пробирке крови и сыворотки одного донора и комплект для онкоцитологии (три стекла). Три референтные лаборатории получали по шесть пробирок крови и сыворотки (количество доноров). Соблюдение температурного режима (наличие у курьеров термоконтейнеров) при транспортировке до места исследования жестко контролировалось организаторами МЛСИ. Исследования во всех лабораториях проводились одновременно на второй день соревнований в 08:30–12:00. Результаты согласно утвержденным формам отсылались электронной почтой с 12:00 до 15:00. Результаты исследо-

ваний трех референтных лабораторий по каждому аналиту усреднялись. В качестве допустимых интервалов были установлены: для гемоглобина 4%, лейкоцитов 7%, эритроцитов 5%, тромбоцитов 14%, аланинаминотрансферазы 10%, общего белка 5%, билирубина 15%, мочевины 10%, триглицеридов 15%. Корректный результат исследования трех мазков на онкоцитологию оценивался за 100%.

Выводы. Найдено решение для обеспечения лабораторий бесплатными контрольными материалами для проведения МЛСИ. 1) Испытания дали возможность оценить качество работы лабораторий в целом по ЮКО и по каждой лаборатории — участнице МЛСИ. 2) МЛСИ явились реальной помощью для лабораторий при их подготовке к государственной аккредитации. 3) Опыт проведенных испытаний показал возможность их регулярного проведения в отдельно взятом регионе.

Качество интерпретации лабораторных исследований врачами-терапевтами

А. П. Ефимова

БУ ВО «Сургутский государственный университет», г. Сургут, Ханты-Мансийский автономный округ — Югра

Quality of laboratory tests interpretation by therapists

L. P. Efimova

Surgut State University, Surgut, Russia

Цель. Сравнить интерпретацию лабораторных данных врачами-терапевтами и специалистами клиничко-диагностических лабораторий (КДЛ) для определения резерва повышения качества лечебно-диагностического процесса.

Материалы и методы. Сравнительная оценка исходного уровня знаний по интерпретации лабораторных показателей выполнена у врачей-терапевтов и специалистов клинических лабораторий лечебно-профилактических учреждений Ханты-Мансийского автономного округа — Югры при прохождении учебного курса Российского научного медицинского общества терапевтов (РНМОТ) по общему анализу крови. Проведен тестовый контроль с использованием тестов 1–3 уровней. Вопросы тестов включали оценку количественных показателей общего анализа крови, эритроцитарных индексов, изменений показателей общего анализа крови при анемиях. Содержание тестов было максимально приближено к реальной клинической терапевтической практике и представляло оценку знаний лабораторных тестов на уровне принятия решения. Участники тестирования получили 10 тестов, выполнить которые они должны были за 15 минут. В тестировании приняли участие 77 человек, из них 39 врачей-терапевтов и 38 специалистов клиничко-диагностических лабораторий с высшим образованием из тех же лечебно-профилактических учреждений, что и терапевты. Среди специалистов лабораторий были 28 врачей клинической лабораторной диагностики и 10 биологов клинических лабораторий. Результаты тестирования оценивали в баллах, соответствующих количеству правильных ответов и в процентах, где за 100% принимались 10 баллов. Результаты тестирования в группах сравнивали с помощью критерия хи-квадрат. Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета Statistica 6.0.

Результаты. Количество лиц со 100% правильных ответов в обеих группах статистически не различалось и составило 43,5% среди терапевтов и 44,7% среди специалистов КДЛ. С более чем половиной предложенных заданий справились около 50% тестируемых из обеих групп: результаты от 60 до 90% показали 46,1% терапевтов и 52,6% специалистов КДЛ. Менее половины правильных ответов (от 20 до 40%) показали 10,3% терапевтов. Один специалист КДЛ ответил на половину предложенных тестов (это составило 2,6% от общего количества участников тестирования в группе), у всех остальных специалистов КДЛ знания были выше. Различия в частоте встречаемости низкого уровня интерпретации в исследуемых группах не были статистически значимыми вследствие небольшого объема выборки. Возможно, при увеличении объема выборки в дальнейшем можно будет более точно составить представление в рамках поставленной нами цели. Однако даже одно неправильно принятое на основании слабого уровня знаний по интерпретации лабораторных показателей решение может значительно снизить качество лечебно-диагностического процесса. Врачи-терапевты принимают решение по результатам лабораторных исследований, что определяет необходимость повышения их знаний и умений по интерпретации.

Выводы. 1) Результаты оценки знаний по интерпретации лабораторных показателей в целом несколько выше у специалистов КДЛ, чем у врачей-терапевтов. 2) Повышения качества лечебно-диагностического процесса в терапевтической практике можно добиться путем повышения умения терапевтов грамотно интерпретировать лабораторные тесты. 3) Существует перспектива улучшения взаимодействия клиники и лаборатории путем повышения умения специалистов КДЛ грамотно интерпретировать лабораторные тесты.

Трансляционная офтальмология: российский опыт

М. Е. Иванова^{1,2}, И. В. Зольникова³, В. В. Стрельников⁴

¹ООО «Офтальмик», ²МЦ Атлас, ³ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Минздрава России, ⁴ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; г. Москва

Translational ophthalmology: Russian experience

M. E. Ivanova^{1,2}, I. V. Zol'nikova³, V. V. Strel'nikov⁴

¹Offalmic Co., ²Atlas Medical Center, ³the Moscow Scientific and Research Institute of Eye Diseases n.a. Helmholtz, ⁴the Medical and Genetic Scientific Centre; Moscow, Russia

Мы находимся на этапе понимания необходимости согласованного междисциплинарного подхода в диагностике и лечении сложных глазных заболеваний. Это требует участия специалистов разного профиля и обработки большого количества информации для подбора той схемы лечения, которая даст ярко выраженный эффект в виде сохранения и улучшения зрения, предотвращения рождения слепого ребенка в семье, прогнозирования скорости снижения зрения.

Цель. Провести анализ обратившихся за проведением генетического тестирования пациентов с глазной патологией.

Материалы и методы. С 2008 года нами были обследованы 1 252 пациента из России и 11 стран СНГ с редкими моногенными глазными заболеваниями, а также другими заболеваниями, которые доказанно имеют признаки наследования (многофакторные глазные заболевания). Медицинское обследование проводилось на базе МЦ Атлас, электрофизиологические исследования в МНИИ глазных болезней имени Гельмгольца, генетические анализы проводились на базах частных и государственных генетических лабораторий.

Результаты. Наиболее частые диагнозы обращавшихся к нам пациентов представлены в таблице.

Диагноз	Количество пациентов
Пигментная абитрофия сетчатки	119
Болезнь Штаргарда	62
Синдром Ашера (Ушера)	87
Врожденная и ювенильная глаукома	17
Синдром Петерса / Аксенфельда Ригера	13
Атрофия зрительного нерва (в т.ч. нейропатия Лебера)	254
Возрастная макулярная дегенерация	243
Ретинобластома	26
Амавроз Лебера	18
Альбинизм глазной и глазокожный	12
Врожденная катаракта	23
Дистрофия роговицы наследственная	25
Микрофтальм / анофтальм	12
Болезнь Беста	39
Патологическая прогрессирующая миопия высокой степени	127
Увеит идиопатический рецидивирующий	78
Семейная экссудативная витреоретинопатия	3
Ахроматопсия	8
Другой диагноз	86
Итого	1 252

Процент выявляемости мутаций составил 38% во всей выборке. По нашим подсчетам и имеющимся эпидемиологическим данным, число пациентов в России, которым подходы трансляционной офтальмологии могут дать ощутимую пользу в принятии решения о способах лечения и планировании семьи, приближается к 70 тысячам семей. С включением жителей стран СНГ эта цифра удваивается. Основной упор первых восьми лет работы в области трансляционной офтальмологии был сделан на внедрении лучшего мирового опыта в этой области, создании базы структурированных данных, включающей сбор более 120 клинических параметров каждого пациента в личной беседе или с помощью опросников (и онлайн-опросников) инфраструктуры в виде взаимодействия различных медицинских учреждений и исследовательских групп, а также биоинформатиков и организации последовательности оказания медицинской помощи этим пациентам с учетом международных стандартов. На текущий день количество клинических и генетических данных о пациентах, имеющихся в нашем распоряжении, начинает расти в нелинейной прогрессии, так как ведется работа по расширению сотрудничества с медицинскими центрами и врачами, через кабинеты которых проходят большее количество пациентов с моногенными глазными заболеваниями. Сдерживающим фактором является стоимость проведения

генетического тестирования, поэтому не всем пациентам был проведен генетический тест в должном по международным рекомендациям объеме для подтверждения или исключения генетического диагноза, однако в последние годы ситуация начала изменяться к лучшему. Происходит унификация выдачи результатов генетического тестирования, увеличивается осведомленность врачей о наличии и необходимости проведения генетического тестирования как первого шага на пути применения подходов трансляционной медицины в офтальмологии. Нами проводится сбор биообразцов пациентов (ДНК, цельная венозная кровь, в целом собраны 950 образцов) для возможности провести анализ ДНК пациентов при появлении новых более точных тестов, а также в рамках проектов, финансируемых из грантовых средств. Проводится работа по организации легального функционирования биобанка, для чего необходимо реструктуризовать хранящиеся образцы, сертифицировать биобанк с учетом требований международной ассоциации биорепозитория ISBER. Есть понимание необходимости применения алгоритмов гибкого управления проектами в условиях быстрого изменения внешних условий среды, применения agile-технологии, разработки собственных и применения уже имеющихся комплексных тестов ДНК-РНК-белок, то есть применения ОМИКСных подходов.

Выводы. В текущий период ведется работа по регистрации ряда обсервационных и интервенционных клинических испытаний на территории России для перечисленных категорий пациентов с целью получения возможности провести синхронизацию диагностических и лечебных протоколов с ведущими университетскими клиническими центрами мира.

Роль биобанкирования в биомедицинских исследованиях — от фундаментальной науки в клиническую практику

М. В. Пузанов, А. А. Гиршова, Ю. В. Миролюбова

ФБГУЗ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Role of biobanking in biomedical researches — from basic studies to clinical practice

M. V. Puzanov, A. A. Girshova, Yu. V. Mirolyubova
The North-West Federal Medical Research Centre n.a. V. A. Almazov, Saint Petersburg, Russia

Введение. Первый в России биобанк был создан в 2012 году на базе СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова как репозиторий биологических образцов и ассоциированной с ними информации для ведения научной работы в рамках крупномасштабных мультидисциплинарных и мультицентровых исследовательских проектов. Биобанк от коллекции биообразцов отличают следующие характеристики: наличие систематизированной клинической информации, ассоциированной с каждым биообразцом; непрерывность хранения и накопления образцов; независимость сбора, систематизации и хранения биообразцов от какого-либо конкретного исследования; доступность биоматериала, хранящегося в биобанке, для любого научно-исследовательского коллектива. Кроме того, биобанк СЗФМИЦ оказывает услуги по рутинному охарактеризованию биообразцов, первичной пробоподготовке биологиче-

ского материала для научных и клинических исследований и т.д. В нестандартных клинических ситуациях биобанк также оказывает помощь в проведении клинико-лабораторной диагностики. Так, представлены два клинических случая онкогематологического заболевания, в которых уточнение диагноза стандартными методами лабораторной диагностики вызвало затруднения. Клинический случай № 1. Пациент А., мужчина 30 лет, обратился в центр им. Алмазова с диагнозом «Т-лимфобластная лимфома / острый лимфобластный лейкоз». Особенности иммунофенотипа опухолевых клеток: экспрессия миелоидных и Т-клеточных маркеров. Возможности ИГХ-анализа не позволили четко установить, относится ли экспрессия к разным клеточным популяциям или имеет место коэкспрессия на одних и тех же опухолевых клетках. Клинический случай № 2. Пациент К., мужчина 51 года, обратился в центр им. Алмазова с диагнозом «хронический миелолейкоз». Осложнение: увеличение шейных лимфоузлов (экстрамедулярные очаги гемопоэза). Типирование опухолевых клеток методом ИГХ вызвало затруднения.

Цель. Развите методов персонализированной медицины в СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова. Внедрение методики выделения опухолевой клеточной популяции из биоптата пораженной ткани для ее дальнейшего иммунофенотипирования методом проточной цитофлуориметрии.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили биоптаты пораженных лимфатических узлов от двух пациентов. Фрагменты тканей гомогенизировались в теплом (+37 °C) 0,05-процентном растворе трипсина, после чего инкубировались в этом же растворе в термостате при +37 °C в течение 30 минут. Образцы отмывались от фермента фосфатно-солевым буфером, ресуспендировались в полной культуральной среде и культивировались при стандартных условиях культивирования (+37 °C, 5 % CO₂). Популяция опухолевых клеток выделялась в градиенте адгезии к культуральной поверхности — для исследования отбиралась суспензионная фракция клеток. Иммунофенотипирование проводилось на проточном цитофлуориметре с использованием моноклональных антител к поверхностным маркерам CD34, C38, CD117, C13, CD33, CD11c, CD7, HLADR, CD71, CD3, CD13, CD15, CD11b, MPO.

Результаты. Клинический случай № 1. Т-лимфобластная дифференцировка подтверждена сохранением выраженной экспрессии CD3-атипичными клетками в иммуногистохимическом исследовании л/у и в 28-процентной бластной популяции, исследованной методом проточной цитофлуориметрии. Определяемая при ИГХ и ИФТ экспрессия маркеров ранней дифференцировки CD34+, C38+, CD117+, C13+, CD33+, CD11c+/-, CD7+, HLADR+, CD71+ не противоречит диагнозу и соответствует как миелоидной саркоме из ранних клеток предшественников, так и ранней Т-лимфобластной дифференцировке. Проведен индукционный курс в рамках протокола GMALL 1993 с оценкой эффективности на день 15-й — достигнут положительный эффект в виде редукции объема периферической лимфаденопатии более чем на 60%. Проведен интенсивный курс ПХТ в рамках GMALL 2003 — SLAEG. Констатирована полная клинико-гематологическая, цитогенетическая ремиссия заболевания. Клинический случай № 2. В ходе госпитализации верифицирован экстрамедулярный бластный криз на основании выявления

при цитологическом исследовании пунктата лимфоузла развернутого миелопоэза и бластной популяции до 10%, подтвержденной миелоидной природой бластов по данным проточной цитофлуориметрии (40-процентная бластная популяция с созреванием с суммарным фенотипом CD13+, CD33+, CD15+, CD11b+, MPO+, CD34-, CD38-, HLADR-. M2-вариант по FAB). Начата терапия ингибиторами тирозинкиназ II поколения дазатинибом с удовлетворительной переносимостью и отмечаемым на фоне терапии положительным эффектом в виде редукции размеров периферических лимфоузлов (более 80%).

Выводы. Являясь обязательным условием развития персонализированной медицины, классические методы клеточной биологии могут быть внедрены в рутинный клинико-диагностический лабораторный процесс с целью выявления индивидуальных характеристик заболевания пациента, решения нестандартных диагностических задач и, как следствие, повышения эффективности проводимого лечения.

О результатах отбраковки биопроб крови на преаналитическом этапе лабораторного исследования в централизованной клинико-диагностической лаборатории

С. Н. Суплотов¹, Н. А. Сорокина², И. В. Пашкина¹

¹ГБОУ ВПО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, ²ГБУЗ ТО «Областная клиническая больница № 1»; г. Тюмень

Results of rejection of bioassays of blood on pre-analytical stage of laboratory research in centralized clinical diagnostic laboratory

S. N. Suplotov¹, N. A. Sorokina², I. V. Pashkina¹

¹Tyumen State Medical University; ²the Regional Clinical Hospital № 1; Tyumen, Russia

Активное внедрение централизации клинических лабораторных исследований определяет необходимость соблюдения должной технологии забора и подготовки биоматериала для транспортировки его в централизованную клинико-диагностическую лабораторию (ЦКДЛ). Одним из ведущих критериев этого процесса являются показатели процесса отбраковки биоматериала, проводящегося перед аналитическим этапом лабораторного исследования. Целью настоящей работы являлась количественная оценка факторов, ведущих к отбраковке в ЦКДЛ биопроб крови, доставленных для проведения анализа.

Материал и методы. Исследование проводилось в течение 2014–2015 гг. в ЦКДЛ города Тюмени, располагающейся на базе областной клинической больницы № 1. Указанная ЦКДЛ обслуживает 23 медицинских организации, из них 12 городских амбулаторно-поликлинических учреждений и 11 районных медицинских учреждений стационарного типа. Из поступающего для исследования биоматериала оценка отбраковки проводилась для биопроб крови, предназначенных для гематологических и биохимических исследований, включая коагулологию.

Результаты исследования, проведенные в 2014 году, показали, что наиболее частой причиной отбраковки биопроб крови являлось образование сгустка в вакутейнере (0,57%), ошибки штрихкодирования пробирки или заказа на исследование (0,043%), неправильное взятие крови (0,04%) и ге-

молиз крови (0,01%). При этом в 2014 году ЦКДЛ провела 5401 707 гематологических и биохимических исследований. В целом полученные данные были расценены как наличие существенных нарушений технологии выполнения преаналитического этапа в части заказа и забора биоматериала для лабораторного исследования. С целью минимизации выявленных нарушений сотрудниками ЦКДЛ в начале 2015 года были проведены проверки соблюдения правил выполнения преаналитического этапа лабораторных исследований в лечебно-профилактических учреждениях, направляющих биоматериал для лабораторного анализа. Дополнительно была проведена школа-семинар по предупреждению нарушений технологии забора крови и ее доставки в ЦКДЛ. Проведенные мероприятия позволили снизить количество отбракованных проб по указанным выше причинам. В частности, по итогам работы ЦКДЛ в 2015 году число проб с наличием сгустка в вакутейнере составило 0,12%, ошибки штрихкодирования — 0,03%, а количество проб с гемолизом крови практически отсутствовало (0,00%). К сожалению, остался неизменным процент отбракованных биопроб (0,04%) вследствие неправильного взятия крови, в основе которого несоответствие типа вакутейнера назначенному исследованию.

Заключение. Персонал лечебно-профилактических учреждений, осуществляющий забор и доставку биопроб крови для исследований в ЦКДЛ, должен иметь соответствующую подготовку к проведению данных процедур. При их обучении особое внимание следует обращать на наличие ошибок при проведении штрихкодирования биоматериала и взятии крови в вакутейнеры с наполнителями (реагентами), соответствующими тому или иному виду исследования.

Медицина «5 П» и научные платформы Министерства здравоохранения РФ — основа новой национальной системы здравоохранения России

С. Н. Щербо, М. И. Савина, В. А. Беспалова, Д. С. Щербо

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

*'5 P'-medicine and scientific platform of Russian Federation's
Ministry of Health — basis of new national system of health*

S. N. Shcherbo, M. I. Savina, V. A. Bepalova, D. S. Shcherbo
The Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov, Moscow, Russia

В последнее время происходят существенные изменения в вопросах формирования представлений о тенденциях и направлениях развития здравоохранения. По нашему мнению, сформировалась медицина «5 П»: предиктивная, превентивная, партисипаторная, персонализированная и прецизионная, которая на основе прорыва в естественных науках и информационных технологиях позволяет транслировать новейшие инновационные достижения в клиническую практику. Возрасла роль прецизионной, трансляционной, цифровой и лабораторной медицины, биоинформационных технологий и мобильного здравоохранения в доступности, экономичности и оптимизации оказания медицинской помощи. Особенно впечатляющими являются достижения медицины «5 П», связанные с фармакологией (персонализированные лекарства), онкологией, разделением на типы и лучшее по-

нимание патогенеза заболеваний. Опубликованные недавно 14 научных платформы МЗ РФ посвящены различным медицинским направлениям: онкологии, сердечно-сосудистым, неврологическим, эндокринным и другим заболеваниям, профилактической медицине. В каждом из направлений выделены приоритеты развития медицинской науки и внедрения ее достижений в национальную систему здравоохранения. Приоритетными являются технологии молекулярной медицины, поиск новых биомаркеров (генетических, транскриптомных, протеомных и др.) и создание современных диагностических панелей, в том числе и предиктивных для раннего выявления различных заболеваний, а также создание баз данных медицинской информации. Сочетание геномных, протеомных, метаболомных баз данных и медицинской визуализации также внесет новизну в сферу диагностики и позволит автоматически сопоставлять информацию, полученную из разных методик: цифровые фотографии тканей с высоким разрешением, которые сравниваются с образцами других пациентов для правильной диагностики опухоли. Исследователи будут анализировать геном пациента, чтобы оценить эффективность того или иного вида терапии в каждом конкретном случае и подтверждать это томографией. Геномные и экспрессионные данные самого высокого разрешения, лежащие в основе анализа, показывают значительные динамические изменения в различных молекулярных компонентах и биологических путях в условиях нормы и болезни. Поиски ответа на вопрос, как правильно распорядиться результатами генетического тестирования, могут привести к совершенно новым подходам к исследованию патогенеза заболеваний человека

II. Персонализированная лекарственная терапия, фармакогенетика и фармакогеномика

Персонализированный подход к лечению миомы матки

А. Х. Бехбудова¹, Е. Н. Карева², О. С. Горенкова³,
Т. Е. Самойлова⁴

¹ ООО «Атлант Клиника», ² ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, ³ ФБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», ⁴ ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр имени Н. И. Пирогова» Минздрава России; г. Москва

Individual approach to uterine fibroid treatment

L. Kh. Bekhbudova¹, E. N. Kareva², O. S. Gorenkova³, T. E. Samoylova⁴

¹ Atlant Clinical Co., ² the Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov, ³ the Moscow Region Scientific and Research Institute for Obstetrics and Gynecology, ⁴ the National Medical and Surgical Centre n.a. N. I. Pirogov; Moscow, Russia

Цель: изучить экспрессию генов рецепторов стероидных гормонов в мононуклеарных клетках периферической крови пациенток с миомой матки до и после лечения мифепристоном в зависимости от показателей эффективности терапии и наличия нежелательных явлений.

Задачи: 1) оценить клиническую эффективность применения мифепристона (гинестрил 50 мг в сутки внутрь ежедневно три месяца) в терапии миомы матки у пациенток репродуктивного возраста; 2) определить экспрессию генов рецепторов эстрогенов, гестагенов, глюкокортикоидов и андрогенов в клетках мононуклеарной фракции периферической крови пациенток с миомой матки на 19–21-й дни м.ц.; 3) исследовать влияние мифепристона (Гинестрил 50 мг в сутки внутрь три месяца) на экспрессию генов рецепторов эстрогенов, гестагенов, глюкокортикоидов и андрогенов в мононуклеарных клетках периферической крови пациенток с миомой матки; 4) сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов в клетках мононуклеарной фракции крови пациенток и клинической эффективности мифепристона в лечении миомы матки; 5) оценить частоту встречаемости мифепристон-индуцированной железистой дилатации эндометрия у пациенток с миомой матки и возможную зависимость ее от эффективности лечения; 6) сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов стероидных гормонов в мононуклеарных клетках периферической крови пациенток и частоты встречаемости мифепристон-индуцированной железистой дилатации эндометрия у женщин с миомой матки.

Материалы и методы. В исследовании использованы образцы периферической крови 50 пациенток репродуктивного возраста, проходивших обследование и медикаментозное лечение в отделении гинекологической эндокринологии МОНИИАГ и на базе Национального медико-хирургического центра имени Н. И. Пирогова. Пациентки принимали мифепристон (Гинестрил STADA) внутрь начиная с 1–2-го дней менструального цикла ежедневно непрерывно в дозе 50 мг. Курс приема препарата: три месяца. МНФК выделяли из периферической крови в градиенте плотности фикола. мРНК получали из клеток МНФ с помощью набора «Рибо-преп» (AmpliSens, Россия). Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью набора «Реверта-L» (AmpliSens, Россия). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с «Реакционной смесью 2,5× для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» и соответствующими праймерами («Синтол», Россия) на приборе iCycler iQ5 Real-time PCR (BioRad, Германия). В качестве контрольного гена — GAPDH, для оценки числа копий мРНК — ΔC_t -метод: $\frac{1}{2}^{-\Delta C_t}$ и $2^{-\Delta \Delta C_t}$. Относительный уровень мРНК представлен в виде относительных единиц (о.е., $\frac{1}{2}^{-\Delta C_t}$).

Результаты: 1) мифепристон (50 мг внутрь ежедневно три месяца) вызывает регрессию миоматозных узлов у 86 % пациенток. По данным УЗИ, уменьшение размеров миомы матки в среднем составило 44 %; 2) относительная экспрессия генов рецепторов mER, PR-A, GR, AR в клетках мононуклеарной фракции периферической крови пациенток с миомой матки на 19–21-й дни м.ц. составила $0,028 \pm 0,001$, $0,018 \pm 0,005$, $0,017 \pm 0,006$, $0,02 \pm 0,005$ (Me $\pm$ SE, о.е.) соответственно; 3) мифепристон (50 мг внутрь ежедневно три месяца) снижает экспрессию гена ядерного рецептора прогестерона

типа A в 9,8 раза ($p = 0,01$) в мононуклеарной фракции клеток крови пациенток, при этом уровень мРНК mER, GR и AR достоверно не изменяется; 4) у пациенток с отсутствием эффекта мифепристона в отношении размеров миомы в мононуклеарных клетках крови выявлена повышенная экспрессия генов ядерных глюкокортикоидных рецепторов в пять раз ($p = 0,002$) по сравнению с аналогичным параметром у женщин с положительным результатом лечения. Экспрессия генов GR в мононуклеарах пациенток с миомой матки (до начала лечения) имеет отрицательную корреляционную связь с успехом последующей терапии мифепристоном (Spearman $r = -0,46$; $p = 0,02$) и может быть использована с прогностической целью (пороговое значение в о.е., чувствительность 78 %, специфичность 70 %); 5) железистая дилатация эндометрия на фоне лечения мифепристоном (50 мг внутрь три месяца) была выявлена у 11 из 50 (22 %) пациенток и не ассоциирована с эффектом терапии (хи-квадрат = 0,02; $p = 0,86$); 6) в мононуклеарных клетках периферической крови пациенток с железистой дилатацией эндометрия (до начала лечения) снижена экспрессия генов AR в 3,7 раза ($p = 0,03$) по сравнению с аналогичным параметром у женщин с неизмененным эндометрием. Уровень мРНК AR в мононуклеарах периферической крови пациенток с миомой матки имеет отрицательную корреляционную связь с вероятностью развития железистой дилатации эндометрия (Spearman $r = -0,37$; $p = 0,04$) и может быть использован с диагностической целью (пороговое значение в о.е., чувствительность 90 %, специфичность 50 %).

Выводы. Рецепторный профиль иммунокомпетентных клеток может служить косвенным прогностическим признаком эффективности и целесообразности применения мифепристона в терапии пациенток с миомой матки. Увеличение уровня экспрессии гена GR более 0,011 о.е. в мононуклеарных клетках крови пациенток может свидетельствовать о снижении эффективности мифепристона в терапии миомы матки (чувствительность маркера 78 %, специфичность 70 %). Анализ данных параметров позволит прогнозировать исход терапии для подбора оптимального способа лечения пациентки. Снижение уровня относительной экспрессии гена AR менее 0,028 о.е. в клетках мононуклеарной фракции крови свидетельствует о высокой вероятности развития железистой дилатации эндометрия у пациенток с миомой матки на фоне терапии мифепристоном (чувствительность маркера 90 %, специфичность 50 %). Анализ данного параметра поможет выявить пациенток с риском развития железистой дилатации эндометрия позволит проинформировать врача и пациентку и, как следствие, предупредить необоснованные оперативные вмешательства (гистероскопия и резекция), являющиеся дополнительным фактором риска для репродуктивного здоровья женщины. На основании данной работы был создан алгоритм персонализированного назначения мифепристона (50 мг внутрь ежедневно три месяца) пациенткам для лечения миомы матки.

Исследование влияния полиена и омакора на активность показателей антиоксидантной системы крови больных псориазом в опытах *in vitro*

Л. Б. Гайковская, Р. Н. Павлова, Ч. Р. Бейшебаева,
М. Н. Смертина, Ж. В. Антонова, А. А. Карякина,
Н. В. Тюнина, А. И. Ермаков

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

Research of influence a polyene and omakor on activity of indicators antioxidant system of blood a patients with psoriasis in experiences of in vitro

L. B. Gaykovaya, R. N. Pavlova, Ch. R. Beishebaeva, M. N. Smerlina, Zh. V. Antonova, L. A. Karyakina, N. V. Tyunina, A. I. Ermakov
The North-Western State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

Псориаз, как хронический полиэтиологический дерматоз, сопровождается повышением процессов пролиферации, а следовательно, снижением апоптоза кератиноцитов. В ряде работ [Капулер О. М. с соавт., 2006; Корсунская И. М., 2009] показано вовлечение апоптоза в механизм развития псориаза, в том числе за счет блокировки нормального процесса апоптоза у больных псориазом. Одной из причин активации пролиферации кератиноцитов при псориазе является изменение соотношения в клетках восстановленных и окисленных эквивалентов в сторону повышения концентрации восстановленных (снижения окисленных) эквивалентов [Павлова Р. Н. и соавт., 2002, 2013]. Известно, что омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), являющиеся предшественниками противовоспалительных эйкозаноидов, в том числе и резолвинов, участвующих в процессах разрешения воспаления, кроме того, за счет содержания большого количества двойных связей являются субстратами для образования продуктов свободно-радикального окисления (СРО), необходимых для запуска апоптоза, поэтому их применение для коррекции нарушений при псориазе патогенетически обоснованно, однако доза, обладающая наибольшей эффективностью и в тоже время безопасностью, не установлена. Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) широко используются в лечебной практике, в том числе и дерматологии, но вопрос о терапевтической дозе ПНЖК дискутируется в литературе [Громова О. А. с соавт., 2014], дозы, используемые для лечения и профилактики различных заболеваний, существенно различаются: от 250 мг до 5 000 мг в сутки [Malekshahi Morhaham A. et al., 2012; Nobili V., et al., 2013; Much D et al., 2013].

Целью работы явилось исследование влияния различных доз омега-3 ПНЖК на показатели антиоксидантной системы и интенсивность перекисного окисления липидов крови пациентов с псориазом в исследовании *in vitro*.

Материалы и методы. Исследовалась кровь пациентов с псориазом в возрасте от 20 до 80 лет, поступивших на лечение в дерматологическую клинику СЗГМУ им. И. И. Мечникова с обострением вульгарной формы псориаза различной локализации. В качестве источника омега-3 ПНЖК использовались омега-содержащие

препараты полиен и омакор. Полиен — одна капсула весом 1 000 мг, содержащая 25–30 % омега-3 ПНЖК, что составляет 250–300 мг; омакор — одна капсула содержит 900 мг концентрата этиловых эфиров омега-3 кислот (эйкозапентаеновой кислоты [ЭПК] — 46 % [414 мг] и докозагексаеновой кислоты [ДГК] — 38 % (342 мг) и 4 мг альфа-токоферола). Для оценки влияния омега-3 ПНЖК на активность ферментов АОС гемолизат (1: 20), для оценки интенсивности ПОЛ и содержания SH-группы плазму крови пациентов с псориазом инкубировали при температуре 37 °С в течение 15 минут с омега-3-содержащим препаратом в разных концентрациях (в расчете на содержание ПНЖК). В дальнейшем определяли в крови активность каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) по [Арутюнян А. В., и др., 2000], интенсивность перекисного окисления липидов плазмы крови по концентрации малонового диальдегида (МДА) [Коробейникова Э. Н., 1989] и содержание общих SH-групп плазмы крови [Ellman G., 1959]. В качестве растворителя омега-3-препаратов использовался глицерин. Для исследования использовали три концентрации препаратов: 1 — при пересчете соответствующей 1 000 мг в сутки ПНЖК при однократном приеме, 2–3 000 мг в сутки ПНЖК и 3–6 000 мг в сутки ПНЖК. Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартных статистических программ.

Результаты. Полученные данные свидетельствуют о повышении уровня восстановленных эквивалентов у больных псориазом (достоверное повышение концентрации SH-группы плазмы крови и повышение коэффициента КАТ/СОД, показывающего, что разрушение одного из компонентов СРО — перекиси водорода — преобладает над ее образованием). Малые концентрации омега-3 ПНЖК полиена и омакора (соответствующие 1 000 мг в сутки ПНЖК при однократном приеме) снижают интенсивность перекисного окисления липидов (концентрацию МДА) на 10–11 %. Повышение концентрации омега-3 ПНЖК полиена до 3 000 мг в сутки вызывает повышение интенсивности ПОЛ на 13 %, что может способствовать повышению интенсивности апоптоза, но без выраженных деструктивных изменений, в то время как эта же концентрация омакора не вызывает увеличения МДА. Увеличение концентрации полиена до величины, соответствующей 6 000 мг в сутки ПНЖК вызывает повышение интенсивности ПОЛ на 83 %, что может сопровождаться деструктивными изменениями, в то время как такое же повышение концентрации омакора вызывает повышение ПОЛ только на 38 %.

Выводы. Проведенное *in vitro* исследование крови больных псориазом показало, что концентрация омега-3 ПНЖК, соответствующая однократному приему 3 000 мг в сутки, в составе полиена способствует снижению восстановленных эквивалентов и некоторой активации апоптоза без выраженных деструктивных изменений.

Подходы к персонифицированной коррекции нарушений микроэкологии кишечника на основе оптимизации состава пробиотических препаратов по их метаболическим профилям

А. М. Затевалов, А. Ю. Миронов, Е. П. Селькова,
Е. О. Рубальский, Н. В. Гудова, Е. А. Затевалова

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, г. Москва

Approaches to personalized correction of violations of microecology of intestine on basis of optimization of composition of probiotic preparations on their metabolic profiles

A. M. Zatevalov, A. Yu. Mironov, E. P. Sel'kova, E. O. Rubalsky,
N. V. Gudkova, E. A. Zatevalova
The Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology n.a.
G. N. Gabrichevsky, Moscow, Russia

В проведенном исследовании изучается синергетическая способность консорциума штаммов лактобацилл повышать концентрации уксусной, пропионовой, масляной и других летучих жирных кислот при совместном культивировании двух различных штаммов в разных соотношениях по сравнению с концентрациями при культивировании каждого отдельного штамма. Исследуется способность антимикробных препаратов угнетать продукцию летучих жирных кислот микробиоценозом кишечника лабораторных мышей. Предлагается алгоритм подбора оптимального состава консорциума штаммов лактобацилл для компенсации угнетающего действия отдельных химиопрепаратов на микрофлору кишечника.

Цель работы. Определить оптимальные составы консорциумов штаммов лактобацилл для компенсации дефицита ЛЖК при действии антимикробных химиопрепаратов.

Материалы и методы. Изучено состояние микробиоценоза кишечника девяти групп лабораторных мышей по 11 особей при действии восьми антимикробных, гормональных и противоопухолевых препаратов. Определены концентрации компонентов летучих жирных кислот в содержимом кишечника мышей, достоверно снижающихся при действии исследуемых химиопрепаратов. Определены 14 различных составов консорциумов штаммов лактобацилл и концентрации летучих жирных кислот, которые увеличиваются при культивировании консорциумов в результате синергетического эффекта.

Результаты исследования. Сравнили набор компонентов летучих жирных кислот со сниженной концентрацией в результате действия химиопрепаратов на микробиоценоз кишечника мышей и набор концентраций компонентов летучих жирных кислот, увеличивающихся в результате синергетического эффекта культивируемого консорциума штаммов лактобацилл. Определены 6 консорциумов полностью компенсирующих вредное действие преднизолона, и 5 консорциумов — для азитромицина. Другие химиопрепараты компенсируются предлагаемыми консорциумами лишь частично, с различной степенью полноты.

Выводы. 1) Подбор соотношений различных штаммов лактобацилл позволяет определить консорциумы, компенсирующие вредное действие антимикробных препаратов

на микробиоценоз кишечника с различной полной компенсацией. 2) Шесть различных консорциумов штаммов лактобацилл компенсируют угнетение концентрации пропионовой кислоты в кишечнике мышей преднизолоном. 3) Пять различных консорциумов штаммов лактобацилл компенсируют угнетение концентраций пропионовой и масляной кислот в кишечнике мышей азитромицином.

Молекулярно-фармакологический маркер прогноза противорецидивного действия диеногеста у пациенток с эндометриозом яичников

Е. Н. Карева, Н. А. Коцюбинская, Л. С. Булатова

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

Molecular-pharmacological marker anti-relapse action of dienogest in patients with ovarian endometriosis

E. N. Kareva, N. A. Kotsyubinskaya, L. S. Bulatova
The Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov, Moscow, Russia

Введение. Лечение эндометриоза яичников остается актуальной проблемой медицинской науки в связи с широким распространением и неуклонным ростом заболеваемости. Противорецидивное медикаментозное лечение направлено на снижение уровня или активности эстрогенов. В настоящее время гестагеном выбора в лечении эндометриоза любой локализации является диеногест-производное 19-нортестостерона, обладающее мощным прогестагенным и антиандрогенным действием. Несмотря на то что противорецидивная активность диеногеста высока, она не является абсолютной: частота рецидивов после окончания терапии составляет около 10% [Vercellini P., 2009; Shakiba K., 2008; Granese R., 2015]. Выявление факторов риска рецидивирования эндометриоза яичников необходимо для разработки индивидуального плана послеоперационного ведения пациенток и выявления бессимптомных рецидивов. Необходимыми критериями любого маркера прогноза являются доступность, информативность и надежность. Данным требованиям отвечают параметры транскриптома патогенетически вовлеченных факторов в эндометриоидной ткани, полученной в ходе оперативного удаления очагов в яичниках: рецепторы стероидных гормонов (эстрогеновые mER, ER α , ER β ; прогестероновые PGRmC1, mPR, PR-A, PR-B). Поэтому актуальным является поиск молекулярно-фармакологического маркера прогноза противорецидивного действия диеногеста среди транскриптома эндометриоидной ткани.

Цель. Сравнительный анализ экспрессии генов рецепторов прогестерона (PR-A, PR-B и PGRmC1) и эстрадиола (mER, ER α и ER β) в эндометриоидной ткани у женщин в зависимости от эффективности противорецидивной терапии диеногестом. Поиск маркера прогноза противорецидивного действия диеногеста в комплексном лечении эндометриоза яичников.

Материалы и методы. В исследование вошли 79 пациенток репродуктивного возраста: 61 пациентка с эндометриозом яичников без рецидива после комплексного лечения, включающего диеногест и 15 пациенток с реци-

дивом после лечения. Из биоптата ткани выделяли мРНК с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (AmpliSens, Россия), получение кДНК проводили с помощью реакции обратной транскрипции с использованием комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L» (AmpliSens, Россия). Для полимеразной цепной реакции в реальном времени использовали набор готовых реактивов для ПЦР «Реакционная смесь 2,5× для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I», соответствующие праймеры (Синтол) и прибор iCycler iQ5 Real-time PCR (BioRad, Германия). В качестве контрольного гена использовался ген *Gapdh*. Для определения уровней экспрессии генов использовались формулы $0,5^{-\Delta Ct}$ и $2^{-\Delta\Delta Ct}$, данные выражали в о.е. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы GraphPadPrism 5.0

Результаты. Количество мРНК-рецепторов стероидных гормонов в эндометриальной ткани различается у пациенток с и без рецидива заболевания в течение трех лет после окончания гормонального лечения. В частности, выявлено снижение экспрессии гена рецептора *PGRmC1* в пять раз ($p = 0,0081$) у пациенток с рецидивом после лечения диеногест-содержащими препаратами по сравнению с пациентками, у которых рецидива отмечено не было ($1,08 \pm 0,30$ vs $0,16 \pm 0,10$ о.е.).

Выводы. Недостаточное количество мРНК-рецепторов *PGRmC1* может являться причиной дефицита протеина и связывания прогестерона. В нашем случае снижение экспрессии *PGRmC1* становится объяснением возникновения рецидива после прекращения гормонального лечения, следовательно, может служить маркером прогноза эффективности противорецидивной терапии диеногестом.

Персонализированный подход в лечении стероидрезистентных форм истинной акантолитической пузырчатки

А. А. Лепехова, А. С. Духанин, Н. П. Теплюк, Н. Л. Шимановский

ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России; г. Москва

Personalized approach in treatment of steroid-resistant forms of autoimmune pemphigus

A. A. Lepikhova, A. S. Dukhanin, N. P. Teplyuk, N. L. Shimanovsky
The Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov, the First Moscow State Medical University n.a. I.M. Sechenov; Moscow, Russia

Цель. Разработка комплексного лечения системными глюкокортикостероидами (СГК) и азатиоприном больных истинной акантолитической пузырчаткой со стероидной резистентностью (СР) на основании изучения ее молекулярных механизмов.

Материалы и методы. Осмотр, сбор анамнеза; у пациентов проводился забор периферической крови из локтевой вены, из которой были выделены лимфоциты. Исследование молекулярных механизмов СР на рецепторном уровне включало метод ПЦР в режиме реального времени, радиолигандный метод. На основании представленных клинических критериев СР были выделены две группы пациентов: стероидчувствительные СР(–) и стероидрезистентные

СР(+). Из 123 больных стероидрезистентными оказались 44% больных; 56% были стероидчувствительными. Клинические критерии стероидной резистентности включают: отсутствие положительной клинической динамики на относительно высоких дозах СГК при монотерапии, препятствующее дальнейшему снижению гормонов; необходимость комбинированной терапии (СГК и иммунодепрессантов или цитостатиков); частые и упорно протекающие рецидивы.

Результаты. Сравнительный анализ содержания мРНК α -изоформы ГР показал статистически значимое снижение мРНК α -изоформы у 14% СР(+) больных соответственно, по сравнению с медианой контрольной группы СР(–) пациентов. Сравнительный анализ содержания мРНК β -изоформы ГР выявил статистически значимое повышение мРНК β -изоформы у 14% СР(+) больных соответственно, по сравнению с медианой контрольной группы СР(–) пациентов. Данные оценки уровня экспрессии мРНК α - и β -изоформ ГР в группе стероидчувствительных больных свидетельствуют, что экспрессия α -изоформы в два раза выше экспрессии β -изоформы. При сравнительной характеристике числа участков специфического связывания СГК на мембранах лимфоцитов было обнаружено статистически значимое снижение количества мембранных рецепторов у 7% СР(+) больного в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой. При сравнительной характеристике числа внутриклеточных участков специфического связывания СГК было выявлено статистически значимое снижение параметров у 14% СР(+) больных по сравнению с контрольной группой. При сравнительной характеристике количества мембранных и внутриклеточных рецепторов у СР(–) больных радиолигандным методом было выявлено, что количество мембранных рецепторов было в 10 раз выше внутриклеточных. Таким образом, в результате исследования было выявлено, что 35% пациентов СР(+) больных имеют рецепторную патологию, из них: 7% — низкое количество мембранных рецепторов, 14% — низкое количество внутриклеточных рецепторов (за счет α -изоформы), 14% — увеличенное количество β -изоформы ГР. При исследовании α - и β -изоформ глюкокортикоидных, мембранных и внутриклеточных рецепторов у стероидрезистентных больных выявляется гетерогенность: у 14% больных наблюдается снижение экспрессии α -изоформы глюкокортикоидного рецептора [52,85%; 55,44%] при медиане у стероидчувствительных больных 69,17%, [интервал значений 65,03–80,28%] ($p < 0,05$), у этих же больных отмечается низкое количество внутриклеточных рецепторов (за счет α -изоформы) [$0,77 \times 10^3$ на клетку; $0,8 \times 10^3$ на клетку] при медиане $1,08 \pm 0,15 \times 10^3$ на клетку ($p < 0,05$), у 14% пациентов — повышение экспрессии β -изоформы глюкокортикоидного рецептора [48,36%; 49,40%] при медиане 33,99%, [интервал значений 15,03–40,25%] ($p < 0,05$); у 7% снижение количества мембранных рецепторов [$6,91 \times 10^3$ на клетку] при медиане $10,32 \pm 1,03 \times 10^3$ на клетку ($p < 0,05$). В результате проведенного исследования было выявлено, что низкий уровень α -изоформы ГР способствует СР у больных ИАП. Следует отметить, что у больных с низким уровнем ГР α высыпания на первых этапах лечения регрессируют при монотерапии. При снижении СГК не наблюдается генерализации сыпи, отмечается появление единичных пузырей и (или) эрозий. Назначение азатиоприна

не всегда сдерживает появление новых высыпаний и способствует регрессу старых. У больных с высокими значениями β -изоформы ГР наблюдаются торпидное течение и частые обострения ИАП. Следует отметить, что первые высыпания при обострениях у больных появлялись на волосистой части головы и отличались упорным течением и торпидностью к монотерапии СГК. Обострения протекали, как правило, бурно, с быстрой генерализацией высыпаний. При назначении азатиоприна достигался выраженный положительный эффект. При снижении количества мембранных рецепторов кожный процесс носил торпидный характер, наблюдались постоянные единичные пузырьные высыпания. При обострениях заболевание носило генерализованный характер. Назначение азатиоприна сдерживало появление новых высыпаний и способствовало регрессу старых.

Выводы. 1) При ретроспективном анализе историй болезни у 44% больных ИАП из 123 наблюдается стероидная резистентность, которая проявляется обязательными обострениями уже в первый год от начала лечения СГК и ежегодными обострениями в последующем при отсутствии адъювантной терапии. Все больные ПНП (15%) являются стероидрезистентными ($p < 0,05$). 2) Основные механизмы индивидуальной резистентности к СГК у больных ИАП обнаруживаются на молекулярном уровне; так, у 35% стероидрезистентных больных наблюдается поражение рецепторного аппарата, а именно: снижение экспрессии α -изоформы глюкокортикоидного рецептора у 14% больных, у этих же больных отмечается низкое количество внутриклеточных рецепторов (за счет α -изоформы), повышение экспрессии β -изоформы глюкокортикоидного рецептора отмечается у 14% больных, у 7% наблюдается снижение количества мембранных рецепторов. 3) Все выявленные изменения на рецепторном уровне лежат в основе механизмов формирования стероидной резистентности и коррелируют с динамикой заболевания в процессе лечения.

III. Предиктивная медицина. Лабораторные биомаркеры ревматологических и аутоиммунных заболеваний

Предиктивное значение молекулярных и клеточных биомаркеров при системных аутоиммунных заболеваниях

Е. Н. Александрова

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой», г. Москва

Predictive value of molecular and cellular biomarkers for systemic autoimmune diseases

E. N. Aleksandrova

The Scientific and Research Institute for Rheumatology n.a. V. A. Nasonova, Moscow, Russia

Достижения биомедицины в начале XXI века, обусловленные разработкой и быстрым внедрением в практику инновационных молекулярно-клеточных технологий, способ-

ствовали увеличению диагностической чувствительности и специфичности (ДЧ и ДС) лабораторных тестов и существенному расширению спектра исследуемых биомаркеров в ревматологии. В последнее десятилетие для определения биомаркеров системных (органонеспецифических) аутоиммунных заболеваний (САЗ) в крови, синовиальной жидкости, моче, биоптатах синовиальной оболочки, почек, кожи и других пораженных тканей применяют высокотехнологичные автоматизированные аналитические системы с использованием как «классических» униплексных методов иммунохимического анализа (непрямая реакция иммунофлюоресценции, иммуноферментный анализ, иммуноблот, иммунодот, иммунонефелометрия, хемилюминисцентный иммунный анализ, радиоиммуноанализ), так и мультиплексных диагностических платформ на основе ДНК-, РНК-, белковых и клеточных микрочипов, полимеразной цепной реакции, проточной цитометрии, масс-спектрометрии. Современная генерация молекулярных и клеточных биомаркеров (аутоантитела, острофазовые белки, цитокины, хемокины, маркеры активации сосудистого эндотелия, иммуноглобулины, компоненты системы комплемента, субпопуляции лимфоцитов, продукты метаболизма костной и хрящевой ткани, внутриклеточные сигнальные молекулы, протеазы, генетические, эпигенетические, транскриптомные маркеры) является важным инструментом для профилактики, ранней диагностики и прогнозирования течения САЗ. В основе патогенеза САЗ лежит тесное взаимодействие генетических дефектов, эпигенетических механизмов (метилирование ДНК, модификация гистонов, микроРНК) и факторов внешней среды (инфекции, питание, микробиота, ксенобиотики — курение, ультрафиолетовое облучение, тяжелые металлы, фармацевтические агенты и др.), а также посттранскрипционные модификации белков (деиминирование, цитруллинирование, карбамилирование), что приводит к потере иммунологической толерантности в отношении собственных антигенов и развитию аутоиммунитета с нарушением баланса между супрессорными регуляторными Т-клетками (T_{reg} и Tr1) и патогенными эффекторными Т-хелперными клетками (Th1, Th17, T_H), которые стимулируют активацию В-клеток, созревание плазматических клеток, продукцию аутоантител, цитокинов и образование цитотоксических Т-лимфоцитов. Наряду с патологическими изменениями приобретенного иммунитета важную роль в усилении воспаления и деструкции тканей организма играет ранний дисбаланс врожденного иммунитета, в том числе персистирующая активация моноцитов / макрофагов, дендритных клеток, нейтрофилов, естественных клеток-киллеров, тучных клеток, Toll- и NOD-подобных рецепторов, инфламмасом; гиперпродукция IL-1, IL-18, IL-33, IFN- α/β , других провоспалительных цитокинов и локальных тканевых факторов (ферментов, ко-стимулирующих молекул, рецепторных, регуляторных и эффекторных белков). Многие иммунопатологические нарушения, связанные с потерей иммунологической толерантности к собственным антигенам и инициацией системного аутоиммунитета и воспаления, в том числе снижение функциональной активности T_{reg}, образование патогенных аутоантител, повышение уровней острофазовых белков, цитокинов и хемокинов, развиваются в среднем за пять лет до клинической манифестации

САЗ (на стадии «доброкачественного» аутоиммунитета). На ранней клинической стадии системной красной волчанки (СКВ) и ревматоидного артрита (РА), характеризующихся дальнейшей потерей иммунологической толерантности и ускорением аутоиммунного процесса с его трансформацией в «патологическую» фазу, наблюдается значительное увеличение концентрации, avidности, репертуара и патогенного потенциала антинуклеарных антител и антител к цитруллинированным белкам (АЦБ), что обусловлено расширением эпитопов, распознаваемых аутоантителами. Исследование лабораторных биомаркеров на доклинической и ранней стадии САЗ с нечетко выраженными клиническими признаками и «обратимыми» нарушениями аутоиммунитета позволяет своевременно начать адекватную противовоспалительную и иммуносупрессивную терапию в самом дебюте болезни, что увеличивает вероятность достижения ремиссии и снижает риск прогрессирующего деструктивного поражения органов и тканей. В результате комплексного определения в сыворотках крови 102 больных ранним РА концентрации 36 биомаркеров (IgM и IgA РФ, АЦЦП, антител к модифицированному цитруллинированному виментину — АМЦВ, С-реактивного белка — СРБ, кальпротектина, растворимого лиганда рецептора активатора фактора транскрипции κB — pRANKL, хрящевого олигомерного матриксного белка — COMP, 27 цитокинов, хемокинов и факторов роста) с помощью ИФА, иммунофлуориметрии и мультиплексной технологии X-MAP создан комплексный иммунологический индекс для диагностики раннего РА — МИРРА (многопраметический индекс раннего ревматоидного артрита). Компоненты МИРРА отражают воспалительную активность РА (СРБ, IL-6), аутоиммунные нарушения (антитела к циклическому цитруллинированному пептиду — АЦЦП), иммунный ответ по Th1-типу (IFN- γ), активацию процессов гемопоэза (GM-CSF) и хемотаксиса (IP-10). При диагностике раннего РА МИРРА обладает высокой ДЧ (97%) и ДС (94%), превосходя IgM РФ (59%, 79%) по обоим параметрам, а АЦЦП (71%, 97%) по ДЧ. Для ранней диагностики СКВ предложена мультибиомаркерная панель, включающая положительные результаты определения антинуклеарных антител, повышение уровня C4d на эритроцитах (EC4d) и В-клетках (BC4d), а также серонегативность по АМЦВ. Ряд сывороточных биомаркеров используется в качестве предикторов обострения волчаночного нефрита (увеличение концентрации антител к dsДНК и C1q, снижение уровня C3 и C4) и системных васкулитов с поражением почек (возрастание концентрации антител к протеиназе 3). Некоторые аутоантитела обладают паранеопластическими свойствами, и их обнаружение может предшествовать развитию злокачественных опухолей у больных системной склеродермией (антитела к РНК-полимеразе III) и дерматомиозитом (антитела к NXP2 “nuclear matrix protein 2” — ядерному матриксному белку; TIF1 γ “transcription intermediary factor 1 γ ” — промежуточному фактору транскрипции 1 γ). Расшифровка ключевых патогенетических механизмов САЗ позволила идентифицировать молекулярные и клеточные биомаркеры, которые могут быть использованы в качестве терапевтических «мишеней». В настоящее время для лечения САЗ успешно применяются генно-инженерные биологические препараты (моноклональные антитела и ги-

бридные белковые молекулы), селективно ингибирующие провоспалительные цитокины и мембранные молекулы, опосредующие патологическую активацию иммуокомпетентных клеток; выделены лабораторные биомаркеры, позволяющие прогнозировать эффективность терапии САЗ, что создает реальные предпосылки для оптимизации и снижения стоимости лечения этими лекарственными средствами.

Роль мультиплексного иммунного анализа антинуклеарных антител в диагностике, оценке активности и характера течения системной красной волчанки

Ж. Г. Верижникова¹, Е. Н. Александрова¹, А. А. Новиков¹, Т. А. Панафидина¹, Н. В. Середавкина¹, Т. В. Попкова¹, Н. Л. Айзина², Е. Л. Насонов¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой», ²ГУЗ г. Москвы «Детская городская поликлиника № 121» УЗ ЮАО; г. Москва

Role of multiplex immunoassay antinuclear antibodies in diagnosis and assessing activity and character of severity of systemic lupus erythematosus

Zh. G. Verzhnikova¹, E. N. Aleksandrova¹, A. A. Novikov¹, T. A. Panafidina¹, N. V. Seredavkina¹, T. V. Popkova¹, N. L. Ayzina², E. L. Nasonov¹

¹The Scientific and Research Institute for Rheumatology n.a. V. A. Nasonova, ²The City Children's Polyclinic № 121; Moscow, Russia

Введение. Антинуклеарные антитела (АНА) являются основным серологическим маркером системной красной волчанки (СКВ). Метод мультиплексного иммунного анализа (МИА) все чаще внедряется в лабораторную практику. Вместе с тем клиническая информативность определения АНА при СКВ по сравнению с «классическими» униплексными методами иммунного анализа остается недостаточно изученной.

Цель. Оценить диагностическое значение МИА профиля АНА, проследить связь с активностью патологического процесса и тяжестью органного поражения при СКВ.

Материалы и методы. Исследованы сыворотки 94 больных с верифицированным диагнозом СКВ (согласно критериям SLICC, 2012) (80 женщин и 14 мужчин) в возрасте 35,9 (16–65) года, длительностью заболевания 113,5 (2–576) месяца. Степень активности заболевания по шкале SLEDAI-2K — 9,7 (0–40) балла; индекс повреждения SLICC/ACR (ИП) — 1,6 (0–18) балла. Преобладал хронический вариант течения СКВ (60,6%; n=57); острый и подострый варианты составили 23,4% (n=22) и 15,9% (n=15) соответственно. Группа сравнения состояла из 70 больных другими ревматическими заболеваниями. Группа контроля: 30 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными. АНА определялись методом МИА на основе магнитных микросфер при помощи тест-системы BioPlex® 2200 ANA Screen (Laboratories Inc. Hercules, США). Позитивные результаты измерения АНА соответствовали следующим значениям: для антител к двуспиральной (дс) ДНК $\geq 10,0$ МЕ/мл; для других АНА (aSm, aSS-A/Ro 52 и 60 кДа, aSS-B/La, aJo-1, aScl-70, aSm-RNP, антител к нуклеосомам, центромере [CENP-B], рибосомальному белку Р [RibP], рибонуклеопротеину [РНП-70]) $\geq 1,0$ AI (Antibody Index).

Результаты. Определение адсДНК, aSm, aRibP методом МИА показало наиболее высокую диагностическую специфичность (ДС) (95, 97, 99% соответственно) и отношение правдоподобия положительного результата (ОППР) (10,4; 9,67; 15,0 соответственно) для диагностики СКВ. МИА aRNP-70, aSS-A/Ro, антител к нуклеосомам являлся «полезным» тестом для диагностики СКВ (ОППР 2,8; 2,31; 4,15 соответственно). Обнаружение aSS-B/La не имело значения для диагностики данного заболевания (ОППР — 1,2). Частота обнаружения одного АНА у пациентов с СКВ составляла 79,8%, двух АНА — 28,7%, трех АНА — 15,6%, четырех АНА — 10,6%, пяти АНА — 5,3%, шести АНА — 1,1%. Одновременное определение ≥ 3 АНА повышает ДС метода до 98–100%, а ОППР до максимальных значений. SLEDAI-2K положительно коррелировал с концентрацией адсДНК ($r = 0,55$; $p < 0,05$), антител к нуклеосомам ($r = 0,65$; $p < 0,05$), aRibP ($r = 0,32$; $p < 0,05$), aSm ($r = 0,36$; $p < 0,05$). Не обнаружено достоверной взаимосвязи между продукцией АНА и ИП. В зависимости от типа течения СКВ определялась частота выявления АНА. Наибольшее количество АНА было обнаружено при хроническом течении заболевания — адсДНК, aSm, aRibP, aSS-A/Ro, aSS-B/La, антитела к нуклеосомам, aRNP-70 (57,9; 71,9; 82,5; 61,4; 84,2; 50,9; 84,2% соответственно). При остром течении — адсДНК, aSm, aSS-A/Ro, антитела к нуклеосомам (77,3; 45,5; 40,9; 72,7% соответственно); при подостром течении — адсДНК, антитела к нуклеосомам (53,3 и 46,7% соответственно). Частота определения aSmRNP и aScl-70 при всех типах течения СКВ составила 7,0–29,8%. Антитела к CENP-B и Jo-1 обнаружены не были.

Выводы. Одновременное определение профиля АНА методом МИА с использованием суспензионных микроочипов показало высокую специфичность для диагностики СКВ. Уровни адсДНК, антител к нуклеосомам, aRibP и aSm в сыворотке крови положительно коррелируют с активностью заболевания. При хроническом типе СКВ выявляется большее количество АНА, чем при остром и подостром течении заболевания.

Взаимосвязь генетических маркеров и клинических фенотипов при ревматоидном артрите

И. А. Гусева¹, Н. Е. Сорока², Н. В. Демидова¹, Е. Л. Лучихина¹,
Е. Н. Александрова¹, А. А. Новиков¹, Е. Ю. Самаркина¹,
Е. В. Федоренко¹, Д. Ю. Трофимов², Д. Е. Каратеев¹,
Е. Л. Насонов¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой», ²ЗАО «Научно-производственная фирма «ДНК-технология»; г. Москва

Relationship of genetic markers and clinical phenotypes in patients with rheumatoid arthritis

I. A. Guseva¹, N. E. Soroka², N. V. Demidova¹, E. L. Luchikhina¹,
E. N. Alexandrova¹, A. A. Novikov¹, E. Yu. Samarkina¹, E. V. Fedorenko¹,
D. Yu. Trofimov², D. E. Karateev¹, E. L. Nasonov¹

¹The Scientific and Research Institute for Rheumatology n.a. V. A. Nasonova, ²DNA-Technology Co.; Moscow, Russia

Цель. Оценить роль генетических маркеров в формировании предрасположенности, клинико-иммунологической гетерогенности, прогноза течения рев-

матоидного артрита (РА) и эффективности терапии базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) и генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП).

Материал и методы. В исследование включены 336 пациентов с РА (начало болезни в $48,3 \pm 13,2$ года, длительность болезни $6,7 \pm 5,1$ года), из них 123 пациента с длительностью симптомов до включения в исследование менее двух лет (ранний РА, рРА) проспективно обследованы в течение четырех лет. Контрольную группу составили 303 здоровых донора крови. Детекция полиморфизмов генов *PTPN22*+1858C/T, *IL-6*-174G/C, *IL-6R*+358A/C, *TNF- α* -308A/G, *TNFAIP3* T/C (rs675520), *TNFAIP3* A/G (rs6920220), *MCP-1*+258 A/G, *IL-10*-592A/C, —819T/C, —1082A/G, *MTHFR*+677C/T, +1298A/C проведена методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ, PCR-RT) с использованием флюоресцентно-меченных специфичных гибридизационных праймеров с последующей автоматической оценкой кривых температур плавления на амплификаторе ДТ-96 (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия). Высокора разрешающее генотипирование аллелей гена *HLA-DRB1* осуществлено на автоматическом секвенаторе 3130I Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Результаты. Наиболее значимыми генетическими маркерами чувствительности к РА являются аллели гена *HLA-DRB1*, относящиеся к SE (Shared Epitope) (*0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *10) (хотя бы один аллель SE: OR=4,1; $p < 1 \times 10^{-8}$; двойной набор аллелей SE: OR=6,2; $p < 1 \times 10^{-6}$) и аллель T гена *PTPN22* (OR=1,9; $p < 4 \times 10^{-5}$), особенно в гомозиготном состоянии (OR=4,9; $p < 0,005$). Частоты генотипов гена *IL-6R* A/C в подгруппе больных, отобранных для лечения ГИБП (ремикейд, n=64 и тоцилизумаб, n=43), различались при сравнении с подгруппой рРА ($p = 0,01$) и контролем ($p = 0,004$). Логистический регрессионный анализ показал, что среди изученных генетических маркеров аллели SE, особенно в сочетании с АЦЦП (антитела к циклическим цитруллинированным пептидам), являются предикторами прогрессирования эрозивного процесса в суставах в течение первых двух лет проспективного наблюдения больных с ранним РА. Через четыре года наблюдения прогрессирование деструкции суставов было ассоциировано с полиморфизмом гена *MTHFR*+677C/T. Выявлена взаимосвязь полиморфизмов генов *MCP-1*+258 A/G и *IL-6*-174G/C с серологическими маркерами воспаления (СОЭ, СРБ). В проспективном исследовании клинический ответ на терапию тоцилизумабом был ассоциирован с полиморфизмами генов *TNF- α* -308A/G и *TNFAIP3* A/G (rs6920220), ответ на терапию ритуксимабом — с полиморфизмом гена *TNFAIP3* T/C (rs675520).

Заключение. В результате проведенного исследования выявлен ряд полиморфизмов изученных генов, ассоциированных с предрасположенностью к развитию РА, клинико-лабораторными параметрами и эффективностью терапии ГИБП, которые могут быть использованы в практической медицине.

Опыт использования электрокинетических показателей лимфоцитов в качестве диагностических критериев

М. Р. Насыров, В. Б. Метелин, Т. И. Якушина

ФГБОУ ВПО «Государственная классическая академия имени Маймонида», ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского»; г. Москва

Experience in use of electrokinetic parameters of lymphocytes as diagnostic criteria

M. R. Nasyrov, V. B. Metelin, T. I. Yakushina

The State Classical Academy n.a. Maimonid, the Moscow Regional Scientific and Research Clinical Institute n.a. M. F. Vladimirovsky; Moscow, Russia

В контексте диагностики заболеваний особый интерес представляет поиск новых информативных и объективных критериев оценки морфологических и функциональных нарушений. Поверхностный заряд мембраны клеток (Z-потенциал) является одним из важнейших показателей клеточного гомеостаза и во многом обусловлен наличием на мембране заряженных групп биологических молекул, в том числе иммунных комплексов. При обострении патологического процесса количество иммунных комплексов и степень их связывания с рецепторами мембраны лимфоцитов увеличиваются, вызывая изменение поверхностного заряда и, соответственно, их электрофоретических свойств: подвижности лимфоцитов и амплитуды их движения в условиях приложения знакопеременных потенциалов. Это может оказаться ранним диагностическим признаком или одним из маркеров активности течения патологического процесса при аутоиммунных заболеваниях, таких как ремитирующий рассеянный склероз, системная красная волчанка и др.

Цель. Оценить возможность использования электрокинетических показателей лимфоцитов периферической крови в качестве диагностических критериев активности патологического процесса у больных рассеянным склерозом.

Материалы и методы. Изучено морфофункциональное состояние лимфоцитов периферической крови 25 больных с верифицированным диагнозом рассеянного склероза (средний возраст $35,7 \pm 4,3$ года). Группа контроля включала 10 здоровых добровольцев (средний возраст $32,7 \pm 5,1$ года). Обострение РС идентифицировали на основании клинической картины и данных МРТ. Для лечения обострения заболевания больные получали пульс-терапию метилпреднизолоном в суммарной дозе 5 000 мг в течение семи дней. Электрокинетические показатели лимфоцитов периферической крови оценивали с использованием экспресс-метода компьютерного микроэлектрофореза (МЭФ) на базе модуля аппаратно-программного комплекса (АПК) «Биони-МЭФ» (ООО «Весттрейд», Москва). В пробирку с 300 мкл 0,3 М сахарозы добавляли 30 мкл взвеси лимфоцитов, пробу снимали в течение 15 с по четырем полям зрения. Проводили автоматическую обработку записанных видеофайлов с помощью программного пакета NTUComplex. По завершении обработки оценивали следующие параметры клеточной популяции: общее количество клеток, пригодных к обработке; долю неподвижных клеток относительно общего количества клеток

(%); среднее значение амплитуды колебаний (мкм). Статистический анализ экспериментальных и клинических данных проводили с помощью алгоритмов среды MatLab и математического пакета Statistica 6.

Результаты. При исследовании электрокинетических свойств лимфоцитов установлено, что у практически здоровых добровольцев процент неподвижных клеток составил $25,56 \pm 14,8$ с амплитудой колебаний $3,29 \pm 3,1$ мкм, тогда как у больных в стадии ремиссии отмечалось увеличение активности клеток: процент неподвижных Т-лимфоцитов снижался до $9,53 \pm 3,17\%$, амплитуда колебаний увеличивалась до $6,92 \pm 3,01$ мкм. У больных в стадии обострения отмечается высокая активность клеток: процент неподвижных лимфоцитов снижался практически в два раза — $13,64 \pm 0,45\%$, а амплитуда колебаний увеличивалась до $9,28 \pm 1,6$ мкм. После курса терапии преднизолоном в течение семи дней процент неподвижных Т-лимфоцитов незначительно снижался до $11,13 \pm 1,87$, а амплитуда колебаний в среднем уменьшалась до $7,51 \pm 2,03$ ($p < 0,05$), практически достигая значений у больных рассеянным склерозом в стадии ремиссии.

Выводы. Таким образом, изменение электрокинетических показателей лимфоцитов периферической крови (уменьшение амплитуды колебаний, снижение процента неподвижных лимфоцитов) коррелировало с исчезновением клинико-функциональных симптомов болезни и нормализацией лабораторных показателей. Полученные нами результаты указывают, что экспресс-анализ морфофункционального состояния лимфоцитов периферической крови больных с рассеянным склерозом на основе их электрокинетических показателей является эффективным и экономически оправданным. Очевидно, что клеточный электрофорез — один из наиболее простых и доступных методов измерения поверхностного заряда клеток. Применение предлагаемого способа исследования может способствовать ранней диагностике обострений рассеянного склероза и оперативной оценке эффективности проводимых лечебных мероприятий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ по госзаданию № 17.2608.2014/К.

Лабораторные предикторы ответа на терапию иммуновоспалительных заболеваний

А. А. Новиков

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой», г. Москва

Predictors of response to therapy in immune-mediated inflammatory diseases

A. A. Novikov

The Scientific and Research Institute for Rheumatology n.a. V. A. Nasonova, Moscow, Russia

Цель. Разработать многопараметрические диагностические индексы (МДИ) для прогнозирования эффективности терапии генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП) при ревматоидном артрите (РА).

Материалы и методы. В исследование вошли 97 пациентов с РА, 21 из них осуществлялась терапия инфликсимабом (ИНФ), 27 — ритуксимабом (РТМ) и 42 —

тоцилизумабом (ТЦЗ). Эффективность ГИБП оценивалась на 24-й неделе терапии по критериям EULAR. Перед введением препаратов определялись сывороточные уровни аутоантител (ревматоидные факторы (РФ), антитела к циклическому цитруллинированным белкам), маркеров острой фазы воспаления (СОЭ, СРБ, кальпротектин), маркеров костного и хрящевого метаболизма (sRANKL, COMP, MMP-3); цитокинов (IL-1 β , -1 α , -2, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -12, -13, -15, -17, FGF, эотаксин, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α , VEGF). Прогноз значений одной переменной по другим проводили при помощи метода многомерной линейной регрессии (многофакторного анализа).

Результаты. Созданные МДИ способные предсказать эффективность ответа на: ИНФ на основе измерения концентраций: IL-17, -12, -9, СРБ (площадь под характеристической кривой (ППК) 0,96; диагностические чувствительность (ДЧ) 99%, специфичность (ДС) 75%; на РТМ: VEGF, IL-1 α , -10, G-CSF, IgM РФ (ППК 0,99; ДС 96%; ДЧ 99%); на ТЦЗ: MMP-3, VEGF, антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (ППК 0,85; ДЧ 80%; ДС 83%).

Выводы. Кандидатные МДИ для прогнозирования эффективности ГИБП обладают высокой диагностической эффективностью. После валидации данные тесты могут быть внедрены в широкую клиническую практику. Создание МДИ является перспективным направлением при поиске предикторов ответа на терапию иммуновоспалительных заболеваний.

Сравнение цитокиновых профилей при системной красной волчанке и ревматоидном артрите

А. А. Новиков, Е. Н. Александрова, Ж. Г. Верижникова, Т. В. Попкова, Т. А. Панафидина, Д. Е. Каратеев

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой», г. Москва

Comparison of cytokine profiles in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis

A. A. Novikov, E. N. Aleksandrova, Zh. G. Verizhnikova, T. V. Popkova, T. A. Panafidina, D. E. Karateev

The Scientific and Research Institute for Rheumatology n.a. V. A. Nasonova, Moscow, Russia

Цель. Сравнить цитокиновые профили больных системной красной волчанкой (СКВ) и ревматоидным артритом (РА).

Методы. В исследование были включены 80 пациентов с СКВ, 72 женщины, возраст Me (25–75 перцентиль) 31,5 (16–65) года, длительность заболевания: 48 (2–432) месяцев, 74 пациента с РА, 59 женщин, возраст 54,0 (44,0–62,0) года, длительность заболевания 90,0 (30,00–192,0) месяца и 28 здоровых доноров, соответствующих по полу и возрасту обследованным больным. Определение сывороточной концентрации цитокинов осуществлялось технологией X-Map® с использованием набора реагентов Human Grp I Cytokine 27-plex panel (Bio-Rad, США).

Результаты. У пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми лицами достоверно ($p < 0,05$) снижены уровни интерлейкинов (IL)-1 β , -1 α , -2, -9; эотаксина, грануло-

цитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), интерферона (IFN)- γ , макрофагального белка воспаления (MIP)-1 β , фактора некроза опухоли (TNF)- α , васculoэндотелиального фактора роста (VEGF) и повышена концентрация IL-4, -6, -8, -12, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), моноцитарного хемоаттрактного белка (MCP)-1, тромбоцитарного фактора роста (PDGF)-BB, хемокина, выделяемого Т-клетками при активации (RANTES). По сравнению с РА при СКВ достоверно снижены сывороточные концентрации IL-1 β , -1 α , -2, -5, -6, -7, -9, -10, -13, -15; эотаксина, фактора роста фибробластов (FGF), G-CSF, IFN- γ , ИФН- γ -индукбельного белка (IP-10), MIP-1 α , TNF- α , VEGF и повышены уровни IL-4, -8; MCP-1, MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES.

Выводы. При СКВ происходит снижение основных провоспалительных, Th-2-цитокинов, стромальных и ангиогенных факторов. По сравнению с РА цитокиновый профиль больных СКВ характеризуется более высоким уровнем хемокинов.

Возможности культурального метода в диагностике и прогнозировании аутоиммунных вариантов сахарного диабета

Е. А. Репина

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, г. Москва

Possibilities of cultural method in diagnosis and prognosis of autoimmune diabetes' variants

E. A. Repina

Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

Сахарный диабет I типа (СД1) — тяжелое заболевание, в основе развития которого лежат иммунные нарушения, реализующиеся у генетически предрасположенных лиц под воздействием ряда провоцирующих факторов. В предыдущих исследованиях нами доказана ассоциация варианта СД1 в сочетании с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (АИЗ ЩЖ) с полиморфизмом rs 2476601 гена RTPN22.

Цель. Прогнозирование течения иммуногенетических вариантов СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ на основании функциональных иммунологических показателей.

Материалы и методы. Нами обследованы 80 пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ. Из них мы отобрали 35 пациентов с длительностью СД1 от 10 до 25 лет. Поскольку из трех возможных вариантов генотипов полиморфизма rs 2476601 гена RTPN22 — СС, СТ и ТТ генотип ТТ встречается крайне редко, всех пациентов мы разделили на две группы: в первую группу вошли 17 пациентов с генотипами ТТ или СТ; вторую группу составили 18 пациентов с генотипом СС. В контрольную группу вошли 30 здоровых добровольцев без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности по ним. Функциональное состояние лимфоидных клеток мы оценивали по профилю продуцируемых цитокинов в ответ на специфический для СД1 антиген инсулин. Перед определением цитокинов лимфоциты пациентов выделяли из периферической крови методом градиентного

центрифугирования с использованием смеси фиколл-ве-рографина с плотностью 1,077. Клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером с pH 7,2 и ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI 1640 («Панэко», Россия) с добавлением 5-процентной эмбриональной телячьей сыворотки («Панэко», Россия), 20 мкг/мл гентамицина, 2 mM L-глутамина и 2 mM HEPES. Суспензию лимфоцитов в концентрации 106 клеток на 1 мл среды культивировали в пластиковых 24-луночных планшетах (Nunc, Дания) в течение 18–20 часов в CO₂-инкубаторе. По окончании культивирования плашки центрифугировали, супернатанты каждого образца собирали в разные микропробирки и замораживали при –70 °C до момента исследования в них уровня продукции цитокинов. Продукцию цитокинов оценивали методом проточной флюориметрии на двулучевом лазерном автоматическом анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США). Статистическая обработка результатов выполнена с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Сравнение показателей исследуемых групп пациентов проводилось по U-критерию Манна-Уитни. Количественные показатели представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [Q25; Q75]. Критический уровень значимости принимался 2,5 %.

Результаты. При анализе полученных данных нами установлено статистически значимое по сравнению с контролем повышение уровней продукции ИЛ-6 и ФНО α в ответ на ФГА в обеих основных группах ($p = 0,00004 / 0,0006$). Вместе с тем уровень продукции ИЛ-12 в ответ на ФГА был значимо ниже в основных группах по сравнению с контролем ($p = 0,00004 / 0,0006$). Нами выявлены значимые отличия в уровнях продукции ИЛ-1 в ответ на ФГА между основными группами по сравнению с контролем. При этом в основной группе с генотипом ТТ/СТ отмечалось значимое повышение уровня ИЛ-1 по сравнению с контролем. Группа с генотипом СС не отличалась по уровню продукции ИЛ-1 в ответ на ФГА, что свидетельствует о менее агрессивном течении аутоиммунного процесса при данном варианте заболевания. При сравнении этих групп с контролем по уровням продукции цитокинов Т-клеточного иммунного ответа в ответ на ФГА были также выявлены значимые отличия: в группе с генотипом ТТ/СТ отмечалось значимое повышение уровней ИФН γ ($p = 0,019$) и ИЛ-4 ($p = 0,049$), в то время как группа с генотипом СС не отличалась от контроля по уровням продукции этих цитокинов. Уровни продукции ИЛ-2 в ответ на ФГА в основных группах значимо не отличались от контроля. Обращало также внимание значимое снижение уровней продукции ИЛ-10 в ответ на стимуляцию ФГА в обеих основных группах по сравнению с контролем ($p = 0,00004 / 0,0006$). В обеих основных группах отмечалось статистически значимое увеличение показателей продукции провоспалительных цитокинов в ответ на инсулин: ИЛ-1 ($p = 0,00004 / 0,0006$), ИЛ-6 ($p = 0,00004 / 0,0006$), ИЛ-8 ($p = 0,00002 / 0,0006$), ИЛ-12 ($p = 0,00004 / 0,0006$) и ФНО- α ($p = 0,00004 / 0,0006$), а также цитокинов Т-клеточного иммунного ответа: ИФН γ ($p = 0,00004 / 0,0006$), ИЛ-2 ($p = 0,00004 / 0,0006$) и ИЛ-4 ($p = 0,00004 / 0,0006$). Обращало внимание значимое снижение

ИЛ-10 в ответ на стимуляцию инсулином в обеих основных группах по сравнению с контролем ($p = 0,00004 / 0,003$), что свидетельствует о снижении функциональной способности Т-регуляторных клеток.

Выводы. 1) Риск развития и форма течения СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ ассоциированы с полиморфным маркером *rs 2476601* гена *PTPN22*. 2) Инсулин в реакции *in vitro* является диагностическим маркером СД1 у пациентов с сочетанием СД1 и АИЗ ЩЖ. 3) Характер и степень активности аутоиммунного воспаления при различных вариантах СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ зависят от профиля и уровней продуцируемых цитокинов в ответ на ФГА и инсулин. 4) Полученные данные свидетельствуют о повышении воспалительной активности в обеих группах по сравнению со здоровыми, а также об участии как ТН-1, так и ТН-2 ответа в реализации аутоиммунных механизмов при СД1 у пациентов с сочетанием СД1 и АИЗ ЩЖ.

Корреляция высокого уровня двойных негативных В-лимфоцитов периферической крови с активностью системной красной волчанки

Е. В. Супоницкая, А. П. Алексанкин, А. А. Меснянкина, Т. А. Панафидина, С. К. Соловьев, Е. Н. Александрова, Е. Л. Насонов

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой», г. Москва

Association of increased frequencies of peripheral blood double-negative (IGD-CD27-) B-cell subset with disease activity in systemic lupus erythematosus

E. V. Suponitskaya, A. P. Aleksankin, A. A. Mesnyankina, T. A. Panafidina, E. N. Aleksandrova, S. C. Solovyov, E. L. Nasonov
The Scientific and Research Institute for Rheumatology n.a. V. A. Nasonova, Moscow, Russia

Цель настоящего исследования — оценка взаимосвязи между субпопуляциями В-лимфоцитов периферической крови пациентов СКВ и активностью заболевания до лечения ритуксимабом (РТМ) с помощью проточной цитофлуориметрии. Определение корреляции между активностью СКВ и субпопуляциями В-клеток.

Материалы и методы. В исследование включены 23 пациента (21 женщина, 2 мужчин) с активной формой СКВ и 27 здоровых доноров. Возраст пациентов составил: медиана 36 лет (интерквартильный интервал) (30–40); продолжительность болезни: 6,7 года (2–8); индекс SLEDAI-2K: 13,5 (8–19), (SLEDAI-2K ≥ 8 у 18 больных, SLEDAI-2K < 8 у 5 больных); общий BILAG-индекс (посчитан в программе i-BLIPS): 20,5 (14,5–24). Все пациенты получали преднизолон 17,5 (10–25) мг в сутки, микофенолата мофетил (7 пациентов), азатиоприн (5 пациентов), аминохинолиновые препараты (19 пациентов), метотрексат (1 пациент). На проточном цитофлуориметре до лечения РТМ исследовались следующие субпопуляции В-клеток периферической крови пациентов и доноров: CD19+В- лимфоциты, В-клетки памяти (CD19+CD27+), непереключенные (CD19+IgD+CD27+) и переключенные (CD19+IgD–CD27+) В-клетки памяти, наивные (CD19+IgD+CD27–),

двойные негативные (CD19+IgD-CD27-) и транзиторные (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-) В-клетки. У пациентов исследованы лабораторные показатели СОЭ, СРБ, С3 и С4, АНА и anti-dsDNA.

Результаты. Медиана относительного количества (интерквартильный интервал) В-клеток памяти (CD19+CD27+), непереключенных В-клеток памяти (CD19+IgD+CD27+), наивных (CD19+IgD+CD27-) и транзиторных (CD19+IgD+CD10+CD38++CD27-) В-клеток была ниже у пациентов с СКВ по сравнению со здоровыми донорами: 1,3 % (1,0–2,2) vs 2,2 % (1,6–3,3), 2,1 % (1,6–5,9) vs 10,0 % (6,4–12,7), 58,2 % (40,2–66,9) vs 65,8 % (55,1–73,4) и 0,1 % (0,0–0,1) vs 0,1 % (0,1–0,3) соответственно; $p < 0,05$ для всех случаев. Процентное соотношение двойных негативных В-клеток (CD19+IgD-CD27-) у пациентов с СКВ было выше, чем у здоровых доноров: 29,6 % (20,9–41,3) и 9,8 % (8,4–12) соответственно; $p < 0,0001$. В общей когорте СКВ пациентов выявлена негативная корреляция между относительным ($r = -0,59$) и абсолютным значением ($r = -0,59$) В-клеток памяти (CD19+CD27+) и уровнем анти-dsDNA; $p < 0,05$ для обоих случаев. Относительное количество двойных негативных В-клеток (CD19+IgD-CD27-) позитивно коррелировало с индексом SLEDAI-2K ($r = 0,55$), BILAG ($r = 0,55$), СОЭ ($r = 0,60$) и суточной дозой преднизолона ($r = 0,50$); $p < 0,05$ для всех случаев. В подгруппе пациентов с активной формой СКВ ($N = 18$, SLEDAI-2K ≥ 8) эта корреляция была выше: SLEDAI-2K $r = 0,58$; BILAG $r = 0,75$; ESR $r = 0,67$. Выраженная негативная корреляция между относительным количеством двойных негативных В-клеток (CD19+IgD-CD27-) и уровнем С3 и С4 наблюдалась у 17 пациентов с высоким уровнем анти-dsDNA антител (> 50 IU/ml): $r = -0,80$ и $r = -0,59$ соответственно; $p < 0,05$ для двух случаев.

Выводы. Иммунофенотипирование показало снижение относительного количества В-клеток памяти, непереключенных, наивных, транзиторных и увеличение двойных негативных (IgD-CD27-) В-клеток у пациентов с активной формой СКВ. Позитивная корреляция относительного значения двойных негативных В-клеток с индексами активности СКВ (SLEDAI-2K, BILAG), СОЭ, так же как и выраженная негативная корреляция с С3 и С4 может свидетельствовать о важной роли двойных негативных (IgD-CD27-) В-клеток в патогенезе СКВ.

Операционные характеристики различных методов определения аутоантител к антигенам островковых клеток

А. В. Тимофеев

ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Минздрава России, г. Москва

Performance characteristics of various islet autoantibody assays

A. V. Timofeev

The First Moscow State Medical University n.a. I.M. Sechenov, Moscow, Russia

Цель. Аутоантитела к антигенам β -клеток (АТБК) появляются в крови при аутоиммунной реакции против клеток островков поджелудочной железы и служат

патогномоничными маркерами сахарного диабета (СД) I типа. Тесты на АТБК широко используются в дифференциальной диагностике СД. Наличие АТБК позволяет уверенно отличать аутоиммунный СД I типа от других типов и вариантов СД, например, от СД II типа, моногенного СД, панкреатопричного СД. В России за последние 20 лет тесты на АТБК были освоены многими клинико-диагностическими лабораториями (КДЛ) и прочно вошли в диагностический арсенал диабетологов и эндокринологов. Наиболее широко применяются тесты: на «тотальные» антитела к островковым клеткам (ICA, islet cell antibodies); на антитела к инсулину (IA, insulin autoantibodies); на антитела к глутаматдекарбоксилазе (GADA, glutamic acid decarboxylase antibodies); на антитела к внутриклеточной части протеинтирозинфосфатазы (IA2A, insulinoma antigen 2 antibodies; синонимы: antibodies to intracellular portion of protein tyrosine phosphatase, IA-2_{ic} Ab, IA2/ICA512). Диагностическая ценность разных тестов на АТБК неодинакова и зависит от их операционных параметров, прежде всего от чувствительности, специфичности и точности. В свою очередь, операционные параметры любого теста зависят от его методики. В настоящем сообщении представлены результаты оценки операционных параметров четырех методов определения АТБК, используемых в нескольких московских КДЛ, а именно: иммунофлюоресцентного теста на аутоантитела к островковым клеткам (islet cell antibodies, ICA), радиоиммунного теста на аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе (glutamic acid decarboxylase antibodies, GADA) и иммуноферментных тестов на аутоантитела к протеинтирозинфосфатазе (insulinoma antigen 2 antibodies, IA2A) и к инсулину (insulin antibodies, IA).

Материалы и методы. Тесты на антитела провели у 438 детей и подростков с диагнозом СД I типа и у 891 человека без этого заболевания. Для определения ICA использовали классический непрямой иммунофлюоресцентный метод Международной федерации детского диабета, для определения GADA, IA2A и IA — тест-системы Immunotech IRMA Anti-GAD, Medizym Anti-IA2 и Orgentec Anti-Insulin соответственно. Диагностическую чувствительность (ДЧ), диагностическую специфичность (ДС), предсказательную ценность положительного и отрицательного результатов (ПЦПР и ПЦОР) тестов оценивали по таблицам сопряженности признаков, диагностическую точность тестов (ДТ) оценивали по площади под характеристическими кривыми (AUC, area under receiver operating curve). Тесты на ICA выполнялись в институте молекулярной медицины Первого МГМУ имени И. М. Сеченова. Тесты на IA и IA2A выполнялись в этом же институте, в КДЛ научного центра ЭФИС и в КДЛ ЭНЦ Минздрава России, тесты на GADA только в КДЛ научного центра ЭФИС.

Результаты. Наибольшей диагностической ценностью обладает тест на ICA (ДЧ = 88 %, ДС = 96 %, ПЦПР = 96 %, ПЦОР = 94 %, AUC = 0,94). На втором месте находится тест IA2A (ДЧ = 66 %, ДС = 98 %, ПЦПР = 98 %, ПЦОР = 59 %, AUC = 0,82), на третьем — тест на GADA (ДЧ = 73 %, ДС = 84 %, ПЦПР = 75 %, ПЦОР = 83 %, AUC = 0,79). Тест на IA характеризуется очень низкой ДЧ (4,3 %) и отсутствием ДТ (AUC = 0,5).

Выводы. Охарактеризованные нами тесты на ICA, IA2A и GADA рекомендуется применять в диагностике и дифференциальной диагностике СД. Тест на IA с применением тест-системы Orgentec Anti-Insulin не рекомендуется использовать в клинической практике.

Экспрессия генов в крови перед началом лечения как прогностический маркер эффективности антиревматической терапии у больных ревматоидным артритом

Е. В. Четина, Г. А. Маркова, Н. В. Демидова, А. В. Пиванова

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой», г. Москва

Baseline gene expression as prognostic marker of antirheumatic therapy efficacy in rheumatoid arthritis patients

E. V. Chetina, G. A. Markova, N. V. Demidova, A. V. Pivanova

The Scientific and Research Institute for Rheumatology n.a. V. A. Nasonova, Moscow, Russia

Ревматоидный артрит (РА) является одним из наиболее распространенных аутоиммунных ревматических заболеваний, которое представляет собой комплексный системный многофакторный воспалительный процесс, включающий поражение суставов. В терапии РА используются базисные противовоспалительные препараты (БПВП) и генно-инженерные биологические препараты (ГИБТ), которые способны снижать активность заболевания, замедлять его прогрессирование, подавлять воспаление и боль. Однако в связи с неодинаковой эффективностью антиревматических препаратов для больных РА необходим отбор пациентов, нуждающихся в назначении конкретного препарата. Для этого в настоящее время не существует четких рекомендаций. Вместе с тем системный характер РА означает, что эта патология вовлекает многие системы органов и компоненты центрального метаболизма каждой отдельной клетки больного. Поэтому терапия должна приводить к общей нормализации клеточного метаболизма. Поскольку экспрессия генов является наиболее ранним ответом организма на изменения внешней и внутренней среды клетки, иногда задолго до изменений на тканевом уровне, ее можно использовать для оценки состояния больного. Это также обусловлено взаимосвязью процессов, протекающих в крови и тканях сустава при РА. Поскольку глубинные механизмы РА пока до конца не ясны, наиболее простым способом мониторинга развития заболевания и ответа пациента на лекарственные препараты могут служить попытки приблизить экспрессию генов клеток периферической крови в процессе лечения к ее уровню у здоровых доноров.

Целью данного исследования является определение подходов для прогнозирования ответа на терапию посредством анализа экспрессии генов в крови больных ревматоидным артритом

Материал и методы. Обследована кровь 40 больных РА (средний возраст 47,5 года) со средней длительностью заболевания 7,9 недели и 26 здоровых доноров (средний возраст 45,1 года). Все больные получали терапию метотрексатом (МТ) (15 мг в неделю) в течение двух лет. Кроме того, обследованы 16 больных РА (сред-

ний возраст 53,4 года) с развернутой формой заболевания (длительность заболевания 8,2 года). Данные больные являлись неответчиками на терапию модифицирующих заболевание антиревматических препаратов (DMARDs) и анти-фактор некроза опухолей (TNF) α , поэтому получали терапию ритуксимабом. Клинический ответ оценивали по индексу активности заболевания (DAS)28, реакции оседания эритроцитов (СОЭ), сывороточным уровням антител к циклическому цитрулинированному пептиду (АЦЦП), С-реактивного белка (СРБ) и ревматоидного фактора (РФ). Эрозию кости и сужение суставной щели оценивали рентгенологически. Экспрессию генов определяли в клетках периферической крови посредством ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. Показано, что больные РА не являются однородной группой по экспрессии генов. При этом экспрессия генов повышается при прогрессировании заболевания и снижается в случае успешной терапии, что согласуется с изменениями клинических показателей больных РА. В качестве одного из подходов прогнозирования ответа у больных РА перед началом терапии предлагается корреляционный анализ базальной экспрессии генов с клиническими показателями, измеренными в конце терапии. Наши исследования показали, что в случае терапии метотрексатом, ответимость больных РА ассоциируется с высокой базальной экспрессией генов *mechanistic target of rapamycin (mTOR)*, ингибитора циклин-зависимых киназ p21, маркера апоптоза, каспазы 3, протеазы катепсина К, трансформирующего ростового фактора (TGF) β 1 и относящегося к RUNT-семейству транскрипционного фактора (RUNX)2. Наиболее информативной с точки зрения прогнозирования ответа на терапию МТ (Δ DAS28 > 1,2) оказалась базальная экспрессия p21, каспазы 3 и RUNX2, что было подтверждено посредством анализа профиля ROC-кривых. В случае терапии ритуксимабом оказалось, что высокие исходные уровни экспрессии ULK1 свидетельствуют об ассоциации экспрессии этого гена с положительной динамикой отдельных клинических и лабораторных признаков РА. Другим подходом к прогнозированию ответа на терапию может быть регистрация изменения экспрессии генов при культивировании клеток крови больного РА *in vitro* в присутствии терапевтического препарата перед началом терапии. На модельной системе, включающей культивирование клеток крови больных РА в присутствии рапамицина, ингибитора mTOR, экспрессия которого повышена у большинства пациентов, показано, что снижение экспрессии этого гена, а также генов, ассоциированных с воспалительной активностью — TNF α и (или) деструкцией суставов — металлопротеиназы (MMP)-9 и катепсина К в присутствии данного препарата может указывать на хорошую эффективность терапии.

Выводы. Предложены два подхода для прогнозирования эффективности антиревматической терапии, основанные на анализе изменения экспрессии генов в крови больных РА: 1) корреляционный анализ базальной экспрессии генов в крови с клиническими показателями после терапии и 2) регистрация изменения базальной экспрессии генов в культуре клеток крови больного РА в присутствии терапевтического препарата. Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-04-00038a).

IV. Молекулярно-биологическая диагностика и выбор таргетной терапии онкологических заболеваний

Роль онкомаркеров в дифференциальной диагностике кистозных опухолей печени

В. С. Демидова, П. В. Усякий, А. Ш. Кучейник, В. А. Вишневский

ФГБУ «Институт хирургии имени А. В. Вишневского» Минздрава России, г. Москва

Role of tumor markers in differential diagnosis of cystic liver tumors

V. S. Demidova, P. V. Usyakiy, A. Sh. Kucheynik, V. A. Vishnevsky
The Institute of Surgery n.a. A. V. Vishnevsky, Moscow, Russia

До настоящего времени существуют значительные трудности дифференциальной диагностики кистозных опухолей печени. Злокачественная трансформация является самым грозным осложнением муцинозной цистаденомы (по нашим данным в 17,3%). Ошибки в диагностике и лечении данной патологии обусловлены отсутствием специфических симптомов заболевания и каких-либо нарушений лабораторных показателей крови.

Цель работы. Оценить роль онкомаркеров крови и содержимого кистозных опухолей в дифференциальной диагностике кистозных опухолей печени.

Материал и методы. Обследованы 55 пациентов с опухолями печени, выявлены муцинозные кистозные цистаденомы ($n = 38$), цистаденокарциномы ($n = 5$), внутрипротоковая папиллярно-муцинозная опухоль билиарного типа ($n = 3$), непаразитарные кисты ($n = 3$), метастаз рака яичника в печень ($n = 3$) и другие патологии ($n = 3$). Возраст 24–76 лет, средний возраст 51,7 года. Подавляющее большинство (98%) женщин, из них 44,6% в возрасте 45–59 лет; мужчин 2,1%. Определение онкомаркеров СА 19–9 (карбогидратного антигена 19–9), РЭА (раковоэмбрионального антигена), АФП (альфа-фетопroteина) исследовали в сыворотке крови и в содержимом кистозных опухолей. Определение проводили на автоматическом анализаторе Architect i1000sr (Abbott, США) с использованием реагентов этой же фирмы. Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Для сравнения количественных данных использован критерий Манна-Уитни или t-критерий для зависимых и независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В крови уровень РЭА у пациентов с цистаденомами практически не превышал нормальных значений, в среднем равнялся $1,12 \pm 1,03$ нг/мл и значимо не отличался от уровня у больных с цистаденокарциномами $5,35 \pm 3,55$ нг/мл и с внутрипротоковой папиллярно-муцинозной опухолью билиарного типа $39,63 \pm 63,82$ нг/мл ($p > 0,05$). Также не было достоверной разницы показателей РЭА в крови между группами цистаденокарцином и внутрипротоковой папиллярно-муцинозной опухолью билиарного типа ($p > 0,05$). При оценке результатов СА 19–9 выявлено превышение нормальных значе-

ний в 28% случаев в группе цистаденом ($51,10 \pm 82,59$ ед/мл), при этом в группах злокачественных опухолей было отмечено повышение уровня онкомаркера в 80% до значений $252,25 \pm 409,22$ ед/мл. Наиболее высокие значения получены у пациентов с внутрипротоковой папиллярно-муцинозной опухолью билиарного типа в среднем $11062,77 \pm 18617,56$ ед/мл. При статистическом анализе средний уровень СА 19–9 в крови у пациентов с цистаденомами значимо не отличался от больных цистаденокарциномами и внутрипротоковой папиллярно-муцинозной опухолью билиарного типа ($p > 0,05$). Достоверной разницы в уровне онкомаркера СА 19–9 в крови между группами цистаденокарцином и ВПМО не было ($p > 0,05$). При оценке результатов АФП в крови мы обнаружили незначительное превышение нормального уровня онкомаркера только у одного пациента с цистаденомой и у одного больного с внутрипротоковым папиллярным раком билиарного типа. Средний уровень АФП в крови у пациентов с цистаденомами составил $6,42 \pm 12,19$ нг/мл. Он значимо не отличался от уровня у больных с цистаденокарциномами $3,61 \pm 2,99$ нг/мл и с внутрипротоковой папиллярно-муцинозной опухолью билиарного типа $10,10 \pm 14,30$ нг/мл ($p > 0,05$). Достоверной разницы в уровне АФП между группами цистаденокарцином и внутрипротоковой папиллярно-муцинозной опухолью билиарного типа не было ($p > 0,05$). При анализе взаимосвязи уровня онкомаркеров в крови и размеров опухоли выявлено, что чем больше размер опухоли, тем наиболее вероятно превышение уровня АФП в крови в случаях цистаденом ($r = 0,49$). У больных с внутрипротоковой папиллярно-муцинозной опухолью билиарного типа также выявили превышение уровня всех онкомаркеров в равном количестве при увеличении размеров опухоли ($p = 0,04$). В содержимом кистозных опухолей уровень онкомаркеров СА 19–9 и РЭА нами оценивался у 23 пациентов. Высокие уровни онкомаркеров выявлены во всех случаях как доброкачественных, так и злокачественных опухолей, при этом показатели СА 19–9 при цистаденоме ($1653655 \pm 23199279,5$ ед/мл) значительно больше, чем при цистаденокарциноме ($143263 \pm 185633,9$ ед/мл), однако эти различия недостоверны ($p = 0,12$). У одного пациента при эхинококкозе мы также выявили увеличение уровня СА 19–9 до 234 ед/мл и РЭА до 50 нг/мл. В одном случае ангиомиолипомы отмечено увеличение СА 19–9 до 12000 ед/мл. При анализе уровня РЭА в опухолевой жидкости выявлены наиболее высокие значения у пациентов с цистаденокарциномами — $9134,6 \pm 8294,9$ нг/мл, с цистаденомами — $1088,89 \pm 1696,65$ нг/мл ($p = 0,0002$). Уровень АФП содержимого кистозной опухоли был оценен у 13 пациентов. Высокий уровень онкомаркера 6516 нг/мл мы обнаружили только у одного пациента с цистаденомой и у одного больного с внутрипротоковой папиллярно-муцинозной опухолью билиарного типа 26,62 нг/мл. При оценке взаимосвязи размеров кистозной опухоли печени с уровнем онкомаркеров содержимого опухолей мы не выявили отрицательную корреляцию, то есть даже при больших злокачественных опухолях уровень онкомаркеров в содержимом кистозных опухолей печени может быть минимальным (коэффициент Пирсона $r = -0,21$; $p = 0,007$).

Выводы. В результате наших клинических исследований выявлено, что в опухолевой жидкости высокий уровень СА 19–9 и РЭА обнаруживается в 100% наблюдений, однако мы не получили статистической достоверной разницы между уровнями СА 19–9 при цистаденоме и цистаденокарциноме ($p > 0,05$). Возможно, это обусловлено малым числом пациентов вследствие редкой встречаемости кистозных опухолей печени. При оценке роли уровня онкомаркеров в опухолевой жидкости в дифференциальной диагностике кистозных опухолей печени у нас вызывает сомнение целесообразность определения уровня СА 19–9 и АФП. При значительном превышении уровня РЭА в опухолевой жидкости мы можем предполагать малигнизацию ($p = 0,0002$). В крови уровень РЭА и АФП практически не превышает нормальных значений как в случае цистаденомы, так и при злокачественных кистозных опухолях печени. При увеличении размеров опухоли при цистаденомах отмечается повышение в крови уровня АФП ($p = 0,02$). Наиболее достоверным показателем является повышение в крови уровня СА 19–9, так как согласно нашим данным в 12% следует предполагать цистаденому, а в 7% — злокачественную опухоль.

Тимидинфосфорилаза — перспективный маркер эпителиально-мезенхимальной трансформации опухоли

Е. М. Бакурова, Б. Г. Борзенко, И. В. Василенко

Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького, г. Донецк, Украина

Thymidine phosphorylase as perspective marker of epithelial-mesenchymal transition of tumor

E. M. Bakurova, B. G. Borzenko, I. V. Vasilenko

The Donetsk National Medical University n.a. M. Gorky, Donetsk, Ukraine

Использование методов лабораторной медицины в клинической онкологии может помочь в решении ряда актуальных задач. Среди них оптимизация лечения больных с метастазирующими формами аденокарциномы различной локализации, индивидуальное прогнозирование. Непосредственной причиной неблагоприятного течения, химиорезистентности является развитие эпителиально-мезенхимальной трансформации опухоли (ЭМТ, epithelial-mesenchymal transition). Формирование фенотипических признаков клеток в состоянии ЭМТ-дифференцировки сопровождается падением пролиферативной активности, угнетением иммунных реакций, усилением ангиогенеза, инвазивности и метастазирования. Зачастую ЭМТ носит очаговый характер, поэтому диагностическим морфологическим, иммунно-гистохимическим исследованиям, проводимым в тонких тканевых срезах, может помочь биохимический метод, определение метаболических, белковых маркеров в гомогенатах опухоли, характеризующих большой объем материала. Это может стать новым, актуальным направлением лабораторной медицины в клинической онкологии. Возможным перспективным диагностическим белковым маркером ЭМТ может стать тимидинфосфорилаза. Это фермент «запасного пути» синтеза тимидилата — нуклеотида, лимитирующего скорость синтеза ДНК, связанного с процессами клеточной пролиферации. Тимидинфосфорилаза (ТФ, PD-ECGF; EC 2.4.2.4.) — белок, обладающий не только каталитической активностью, но и ангиогенным,

и антиапоптозным эффектами. Этот полифункциональный белок может непосредственно участвовать в морфогенезе опухолей. Векторность эффектов ТФ зачастую определяется индивидуальными особенностями его каталитической активности. Так, классическая фосфорилазная реакция, реализуя катаболизм тимидина, обеспечивает опухолевый метаболит соединениями с выраженными антиапоптозными свойствами. Трансферазная же активность фермента восполняет клеточный уровень нуклеотида, являющегося субстратом для известного маркера клеточной пролиферации — тимидинкиназы. Эти индивидуальные особенности клеточного метаболизма могут быть непосредственно связаны со сменой интенсивности пролиферации, формированием устойчивости к апоптозу, активацией ангиогенеза. Ранее нами было предложено характеризовать трансферазную активность фермента как анаболическую (ТФан), а фосфорилазную как катаболическую (ТФк). В данном комплексном исследовании виды ферментативной активности ТФ сопоставлены с маркерами пролиферации, ангиогенеза, верификацией ЭМТ в аденокарциномах различной локализации.

Цель. Определить диагностическую значимость видов активности ТФ в качестве метаболических маркеров развития ЭМТ.

Материалы и методы. Исследовали гомогенаты 88 аденокарцином желудка, кишечника, легких T₃₋₄N_xM₀₋₁ стадий. В качестве контроля использовали отдаленные от опухоли нетрансформированные ткани краев резекции. Наряду с тканевой активностью изучались особенности видов активности фермента в плазме венозной крови непосредственно оттекающей от пораженного органа, так и в периферической венозной крови. Виды активности ТФ определяли спектрофотометрически на СФ-46 («Ломо», Россия) при длинах волн 267 и 300 нм по изменениям оптической плотности дезокситимидина / тимина в 0,01 нNaOH. Содержание белка оценивали по методу Лоури. Иммуногистохимически определялись специфический маркер эндотелия сосудов CD34, пролиферативная активность оценивалась по экспрессии Ki-67 в ядрах опухолевых клеток. ЭМТ устанавливали по наличию обособлений опухолевых клеток, приобретению ими фибробластоподобной отростчатой формы, снижению экспрессии панцитокератина AE 1/AE 3, цитокератина 18, потере мембранной экспрессии Е-кадгерина, по появлению экспрессии мезенхимальных морфологических маркеров — виментина, α -гладкомышечного актина. Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили в пакете MedStat (Альфа). Для проверки распределения на нормальность использовался критерий Шапиро-Уилка, что позволяло корректно проводить проверку при небольших объемах выборки. Сравнение выборочных средних значений проводили с использованием критерия Стьюдента для независимых выборок и W-критерия Вилкоксона. Для выявления статистической линейной связи между признаками использовались методы корреляционного анализа, рассчитывался показатель ранговой корреляции Спирмена.

Результаты. Во всех случаях аденокарцином (АК) различной локализации преобладал лишь один из видов активности ТФ. Так, если ее трансферазная активность (ТФан) в опухоли значительно превышала контроль ($194,21 \pm 34,47$ по сравнению с $109,07 \pm 35,41$ нмоль/мин./мг в тканях края

резекции; $p < 0,01$), в них же фосфоорилазная активность (ТФк) имела тенденцию к снижению, но достоверно не отличалась от контроля (соответственно $37,97 \pm 19,57$ и $54,46 \pm 15,75$ нмоль/мин./мг; $p > 0,05$). Это ведет к повышению клеточных уровней дезокситимидина, может способствовать усилению пролиферации. Действительно, АК этой группы характеризовали высокие уровни экспрессии Ki-67. Установлена прямая связь особенностей активности опухолевой ТФан с уровнями экспрессии Ki-67 (показатель корреляции Спирмена $\rho = 0,553$; $p < 0,05$). В ряде опухолей, где, наоборот, преобладала катаболическая активность ТФк, создавались индивидуальные условия для накопления продуктов катаболической реакции — тимина и 2-дезоксид-Д-рибозы (стимуляторов ангиогенеза, помимо этого известны ингибирующие эффекты 2-дезоксид-Д-рибозы на каспазный путь активации апоптоза). В этой группе АК активность ТФк составила $114,60 \pm 23,81$ нмоль/мин./мг ($p < 0,01$), ТФан $73,16 \pm 22,17$ нмоль/мин./мг ($p > 0,05$). Между индивидуальными значениями активности ТФк и уровнями экспрессии CD34 установлена прямая корреляционная связь ($\rho = 0,668$; $p < 0,05$). В этой группе на фоне усиления ангиогенеза были верифицированы и другие морфологические признаки ЭМТ, при этом митотическая активность клеток и экспрессия Ki-67 были крайне низкими (0–5% клеток в поле зрения). Поскольку плазма крови более удобна для широкого применения в клинических исследованиях, то параллельно с тканевыми особенностями активности ТФ мы исследовали их в плазме венозной крови, оттекающей от органа, и в плазме периферической крови. Определили, что особенности видов активности ТФ в оттекающей плазме прямо коррелируют с таковыми в гомогенатах АК. Так, в группе АК с преобладанием активности ТФан плазменная активность была: ТФан $67,55 \pm 11,70$ нмоль/мин./мг, ТФк $5,84 \pm 1,25$ нмоль/мин./мг. В группе АК с преобладанием катаболической активности ТФан в оттекающей плазме была ниже ($p < 0,05$) — $40,40 \pm 6,71$ нмоль/мин./мг; а ТФк, наоборот, достоверно выше ($p < 0,01$), чем в плазме предыдущей группы — $18,60 \pm 4,56$ нмоль/мин./мг. В плазме периферической крови групповых отличий не установлено.

Выводы. Исследование индивидуальных особенностей видов активности ТФ в АК различной локализации может стать диагностическим показателем развития ЭМТ, а именно снижение трансферазной активности на фоне роста фосфоорилазной. В качестве материала может быть использована плазма венозной крови, оттекающей от пораженного органа.

Особенности выявления протеинурии у больных миеломой Бенс-Джонса

Н. В. Инюткина

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского», г. Москва

Features of detection of proteinuria in patients with Bence-Jones myeloma

N. V. Inyutkina

The Moscow Regional Scientific and Research Clinical Institute n.a. M.F. Vladimirovsky, Moscow, Russia

Цель работы. Определить возможности современных лабораторных методов выявлять протеинурию у больных миеломой Бенс-Джонса

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили утренние порции мочи 15 больных множественной миеломой и девяти больных В-клеточной лимфомой без продукции иммуноглобулина. Для определения протеинурии использовали метод сухой химии (автоматический анализатор мочи «Урискан»), метод фотометрического определения общего белка мочи (автоматический анализатор белка в моче «Микролаб-600») и метод качественного определения белка Бенс-Джонса в моче. Присутствие белка Бенс-Джонса в моче подтверждено иммунохимическим исследованием мочи в лаборатории гуморального иммунитета Гематологического научного центра Минздрава России и в лаборатории «Иммунотест» (Европейское качество. Рег. № 2351135).

Результаты. У больных лимфомой, не продуцирующей парапротеин, результаты, полученные методами «сухой» химии и фотометрическим, показали величины в пределах нормы (среднее значение 0,0 и 0,02 г/л соответственно). У больных множественной миеломой средние значения концентрации белка, определенные методом «сухой химии», находятся в пределах референтного диапазона, в то время как применение фотометрического метода выявило значительную потерю белка (0,08 и 0,627 г/л соответственно). Больные множественной миеломой были разделены на две группы: с присутствием белка Бенс-Джонса и без него. Установлено, что для больных множественной миеломой без продукции белка Бенс-Джонса разница в показаниях обоих методов не существенна и составила 0,025 и 0,08 г/л соответственно. У больных множественной миеломой Бенс-Джонса уровень протеинурии, выявленный методом «сухой химии», не превышает референтных пределов, в то время как применение фотометрического метода позволяет выявить значимую протеинурию, свидетельствующую о серьезной патологии мочевыделительной системы (0,12 и 0,99 г/л соответственно). Тяжелое поражение почек при множественной миеломе развивается вследствие фильтрации легких цепей иммуноглобулинов через гломерулярный фильтр и их реабсорбции в проксимальных канальцах, приводящей в итоге к восходящему нефросклерозу. В момент диагностики почечная недостаточность встречается примерно у 25% больных, то есть имеет место запоздавшая диагностика множественной миеломы на стадии осложнений. Это может быть обусловлено и низкой чувствительностью метода «сухой химии», и отсутствием микроскопического контроля мочи при отрицательных результатах определения уровня белка.

Выводы. При подозрении на множественную миелому (анемия, жалобы на боли в костях, неврологическая симптоматика, увеличение концентраций мочевины и креатинина в сыворотке крови) следует обязательно определять уровень общего белка мочи фотометрическим методом с использованием различных красителей. А учитывая данные литературы, что отрицательный результат «сухой химии» не исключает присутствия в моче глобулинов, гемоглобина, уромуконда, необходимо решить вопрос о введении фотометрического способа определения протеинурии в обязательную практику повседневной работы КДЛ.

Возможности применения клеточных биочипов для диагностики онкогематологических заболеваний

С. А. Кузнецова, А. Н. Хвастунова, О. С. Федянина, А. О. Закирова, А. Е. Задорожная, Ф. И. Атауллаханов

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»; г. Москва

Options for cell microarray application to diagnosis in oncohematology

S. A. Kuznetsova, A. N. Khvastunova, O. S. Fedyanina, A. O. Zakirova, A. E. Zadorozhnaya, F. I. Ataullakhanov
The Federal Research and Clinical Centre for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. Dmitry Rogachev, the Centre for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, the Moscow State University n.a. M. V. Lomonosov; Moscow, Russia

Цель. Диагностика онкогематологических заболеваний базируется на комбинации данных морфологии, цитохимических исследований и иммунофенотипирования. Однако существующие на сегодняшний день методы не позволяют проводить определение поверхностных антигенов и изучение морфологии или цитохимии на одних и тех же клетках. Целью данной работы было создание метода для одновременного определения поверхностных маркеров лейкоцитов человека и исследования их морфологии или цитохимии. Для решения данной задачи был использован клеточный биочип — прозрачная пластиковая подложка с адсорбированными на ней пятнами моноклональных антител к поверхностным дифференцировочным антигенам лейкоцитов.

Материалы и методы. Биочип представляет собой прозрачную пластиковую подложку, на которую нанесены антитела к 42 поверхностным дифференцировочным (CD) антигенам лейкоцитов, входящих в обязательные для диагностики лейкозов и лимфом методом проточной цитометрии панели антител по рекомендациям Всемирной организации здравоохранения и Европейской группы по иммунологической характеристизации лейкозов (EGIL), положительный и отрицательный контроли. Каждое антитело нанесено в виде пятна диаметром 2 мм, области между пятнами заполнены бычьим сывороточным альбумином для предотвращения неспецифического связывания. Мононуклеарная фракция выделяется из периферической крови или пунктата костного мозга центрифугированием в градиенте плотности и инкубируется с биочипом без перемешивания. В процессе инкубации клетки оседают на подложку и связываются с иммобилизованными антителами. После отмывки неспецифически связавшихся клеток на подложке остаются области, в которых связаны клетки, несущие на поверхности тот или иной дифференцировочный антиген. Затем биочип со связавшимися клетками высушивается в цитоцентрифуге, после чего клетки готовы к морфологическому или цитохимическому окрашиванию по стандартным методикам. Для оценки уровня неспецифического связывания клеток с антителами на биочипе было использовано иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к основным группам лимфоцитов. Для сравнения нормализованной плотности

связывания клеток в пятнах антител между нормальной периферической кровью и кровью больных с различными лимфопролиферативными заболеваниями В-клеточной природы использовалась кровь 55 здоровых доноров и 70 пациентов с различными лейкозами и лимфомами из зрелых В-лимфоцитов.

Результаты. Для основных групп лимфоцитов периферической крови неспецифическое связывание клеток с антителами не превышает 5%. Для 14 здоровых доноров плотность связывания мононуклеаров периферической крови с антителами к CD3, CD4, CD8 и CD19, нормированная на плотность связывания клеток с положительным контролем, совпадает с долей клеток в исследуемой суспензии, положительных по тем же CD, определенной в той же суспензии методом проточной цитометрии. Таким образом, плотность связывания лейкоцитов с иммобилизованными на биочипе антителами позволяет оценить долю клеток, положительных по соответствующим поверхностным антигенам. Морфология нормальных и патологических клеток периферической крови на биочипе совпадает с морфологией тех же клеток в стандартных мазках. Таким образом, биочип может быть использован для исследования как морфологии, так и поверхностных маркеров лейкоцитов. Для 70 пациентов с В-клеточными лейкозами и лимфомами с лейкоимизацией (37 пациентов с хроническим лимфолейкозом, 22 пациента с волосатоклеточным лейкозом, семь пациентов с лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки, два пациента с лимфомой из клеток мантийной зоны и один пациент с фолликулярной лимфомой) исследовано распределение нормированных плотностей связывания клеток с антителами на биочипе по сравнению с нормой. Показано, что во всех случаях при В-клеточных лейкозах и лимфомах с лейкоимизацией в крови значительно повышается количество В-лимфоцитов и понижается количество Т-клеток, кроме того, у пациентов с волосатоклеточным лейкозом обнаружено повышение количества лимфоцитов, положительных по CD11c, CD103, CD25, у пациентов с хроническим лимфолейкозом по CD5 и CD23, у пациентов с лимфомой из клеток мантийной зоны — CD5, что соответствует литературным данным об иммунофенотипе опухолевых клеток соответствующих опухолей. В тех случаях, когда опухолевые клетки хорошо различимы морфологически, биочип позволяет определить их иммунофенотип, определяя те CD, на антителах к которым связываются клетки с данной патологической морфологией. Для 22 пациентов с волосатоклеточным лейкозом данным методом был исследован иммунофенотип опухолевых клеток. У всех пациентов опухолевые клетки были положительны по CD11c, CD19, CD20, CD22, CD25 и CD103, у шести пациентов, кроме того, опухолевые клетки несли CD2, у одного — CD5, у трех — CD10, у трех — CD23. Данные иммунофенотипы, включая aberrантные коэкспрессии, были подтверждены методом проточной цитометрии. Таким образом, биочип может быть использован для определения иммунофенотипа, соответствующего клеткам определенной морфологии.

Выводы. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что в тех случаях, когда популяция опухолевых клеток может быть выделена морфологически, биочип

может быть использован для постановки предварительного диагноза. Существенные изменения в плотности связывания клеток с различными антителами на биочипе по сравнению с нормой могут указывать на присутствие опухолевой популяции. После этого, выделив морфологически опухолевые клетки, можно определить присутствующие на их поверхности дифференцировочные антигены. Сочетание морфологии опухолевых клеток с их иммунофенотипом позволяет в большинстве случаев поставить предварительный диагноз. Работа частично поддержана грантами РФФИ 16–34–01030 и 16–04–00282.

Молекулярная диагностика онкогематологических заболеваний

А. В. Мисюрин, В. А. Мисюрин, А. А. Крутов,
Ю. П. Финашутин, В. В. Тихонова, Л. А. Кесаева,
И. Н. Солдатова, Е. Н. Мисюрин, А. С. Мкртчян,
С. С. Маркова, К. С. Кайсина, М. В. Телков, С. С. Зборовский
ООО «ГеноТехнология», г. Москва

Molecular diagnosis of hematological malignancies

A. V. Misyurin, V. A. Misyurin, A. A. Krutov, Yu. P. Finashutina,
V. V. Tikhonova, L. A. Kesaeva, I. N. Soldatova, E. N. Misyurina,
A. S. Mkrtyan, S. S. Markova, K. S. Kajsina, M. V. Telkov, S. S. Zborovskij
GeneTechnology Co., Moscow, Russia

Введение. Для онкогематологических заболеваний характерны разнообразные дефекты генетического аппарата столовых кроветворных клеток. При этих заболеваниях часто наблюдают хромосомные аномалии — транслокации, инверсии и делеции, в результате которых происходит перераспределение генетического материала либо между разными хромосомами (транслокации), либо в пределах одной хромосомы (делеции и инверсии). На молекулярном уровне это выражается в том, что в месте слияния генетического материала из разных хромосомных локусов возникают так называемые химерные онкогены, или же создаются условия для гиперэкспрессии важных регуляторных генов. Кроме того, точечные мутации, микроинсерции и микроделеции некоторых генов также могут быть причиной развития онкогематологических заболеваний. Прогрессия опухолевых заболеваний системы крови происходит в результате появления дополнительных генетических дефектов, приводящих к формированию более агрессивных и резистентных опухолевых клонов. Идентификация специфических молекулярных маркеров привела к пониманию тонких механизмов патогенеза и клинической гетерогенности онкогематологических заболеваний. Количественное определение молекулярных маркеров позволяет достоверно устанавливать диагноз, выбирать тактику терапии и судить об эффективности лечения злокачественных заболеваний системы кроветворных и лимфоидных тканей, а также своевременно выявлять признаки развивающегося молекулярного рецидива с целью предотвращения развития рецидива клинического.

Цель. Для комплексной диагностики онкогематологических заболеваний разработать серию диагностических тест-систем на основе ПЦР в реальном времени и изучить диагностическую и прогностическую значимость наиболее распространенных молекулярных маркеров у больных основными видами гемобластозов.

Материалы и методы. В исследование включены взрослые больные с онкогематологическими заболеваниями системы крови: острыми лейкозами, хроническим миелолейкозом (ХМЛ), множественной миеломой (ММ), эритремией, эссенциальной тромбоцитемией, идиопатическим миелофиброзом, первичной медиастинальной лимфомой (ПМБКЛ), диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДБККЛ), лимфомой Ходжкина, фолликулярной лимфомой (ФЛ) из различных гематологических клиник России. Применялись методы секвенирования, полимеразная цепная реакция, реакция обратной транскрипции, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, клонирование.

Результаты. Разработаны высокочувствительные, воспроизводимые и специфичные тест-системы, позволяющие на основе анализа экспрессии химерных онкогенов (BCR-ABL, PML-RARa, AML1-ETO, MLL-AF9, MLL-AF4, AML1-EVI, CBFB-MYH11, E2A/PBX1, SIL/TAL1, TEL/AML1, NPM1-ALK), опухоль-ассоциированных генов (WT1, FLT3, PRAME, XIAP) и анализа мутаций в генах MLL, FLT3, NPM1, JAK2, CALR, BCR-ABL устанавливать диагноз, определять тактику и эффективность терапии, а также проводить эффективный мониторинг минимальной остаточной болезни основных гемобластозов. Обнаружено, что у большинства больных ХМЛ уровень экспрессии гена BCR-ABL хорошо коррелирует с уровнем цитогенетического ответа, однако существует когорта больных, у которых значения молекулярного и цитогенетического ответов существенно различаются, и это является неблагоприятным признаком течения болезни. Показано, что активация экспрессии раково-тестикулярных генов (GAGE1, HAGE, NY-ESO-1, MAGEA1, PASD1, SCP1, SEMG1, SLLP1, SPANXA1, SSX, PRAME) происходит при прогрессии ХМЛ из хронической фазы в фазу акселерации ($p = 0,032$) и бластный криз ($p = 0,048$). Обнаружение мутации гена JAK2 V617F позволяет дифференцировать эритремию и вторичный эритроцитоз. Количественная оценка аллельной нагрузки мутации JAK2 V617F у больных эритремией, тромбоцитемией и идиопатическим миелофиброзом позволяет судить об эффективности терапии. Мутация в гене JAK2 V617F вызывает появление химерного онкогена BCR-ABL и прогрессию этих Ph-негативных хМЛ в 30 % случаев. Низкий уровень экспрессии гена PRAME в дебюте остро-го промиелоцитарного лейкоза увеличивает вероятность раннего развития рецидива ($p = 0,0231$). При молекулярном рецидиве у больных ОПЛ изменение тактики терапии предотвращает развитие гематологического рецидива. Экспрессия гена PML-RARa в период поддерживающей терапии обнаруживается у 40,4 % ($n = 19/47$) больных на 2–3 месяца раньше гематологического. Обнаружение химерных транскриптов гена ALK в крови больных АККЛ методом ПЦР в реальном времени коррелирует с поражением костного мозга. Молекулярный рецидив у больных АККЛ выявляется за три месяца до развития гематологического рецидива. Оценка уровня экспрессии генов JAK2, PDL1, PDL2, MAL, TRAF1 методом ПЦР в реальном времени позволяет использовать данные гены в дифференциальной диагностике ПМБКЛ и ДБККЛ с первичным

вовлечением лимфоузлов средостения. Гиперэкспрессия гена HAGE в клетках костного мозга в дебюте ДБКЛ снижает вероятность достижения ремиссии ($p = 0,093$), а гиперэкспрессия гена PRAME в лимфатических узлах больных ФЛ коррелирует с резистентностью к химиотерапии ($p = 0,0041$). Гиперэкспрессия гена PRAME и XIAP на момент установления диагноза является основанием для лечения больных мм ингибитором протеасом вместо химиотерапии по схеме VAD в связи с большей эффективностью (83,4 против 54% соответственно; $p = 0,08$). Об эффективности противоопухолевой терапии свидетельствует снижение уровня экспрессии гена PRAME ($p = 0,05$).

Выводы. Создание в рамках данного исследования большого числа разнообразных тест-систем на основе ПЦР в реальном времени позволило широко распространить применение молекулярной диагностики гемобластозов и усовершенствовать работу молекулярно-генетических лабораторий и гематологических клиник России. Обнаружение новых факторов прогноза и разработка критериев оценки эффективности терапии позволило внедрить принципы персонализированной медицины в практику лечения онкогематологических заболеваний. Разработанные алгоритмы молекулярного обследования и систематизация молекулярных маркеров существенно упростили процедуру назначения объема диагностики при первичном обследовании и в процессе мониторинга больных гемобластомами.

Диагностика рака предстательной железы

Н. С. Теврюкова¹, В. Н. Богатырев², В. Н. Нидюлин³, С. С. Голубев⁴

¹ООО «Скандинавский центр здоровья»; ²ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва; ³ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет», г. Элиста; ⁴Московская международная лаборатория «Де Жени» (De Genie), г. Москва

Diagnosis of prostate cancer

N. S. Tevryukova¹, V. N. Bogatyryov², V. N. Nidyulin³, S. S. Golubev⁴
¹The Skandinavian Health Center Co., Moscow; ²the Russian Oncological Scientific Centre n.a. N.N. Blokhin, Moscow; ³Kalmyk State University, Elista; ⁴Laboratories De Genie, Moscow; Russia

Цель исследования. Проанализировать взаимосвязь показателя уровня простатоспецифического антигена (ПСА) и степени морфологической дифференцировки рака предстательной железы (РПЖ), а также плоидности опухоли.

Материалы и методы исследования. Показатели уровня ПСА выше пределов нормы получены у больных с РПЖ и доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ). У больных с ДГПЖ показатель уровня ПСА варьировался в пределах от 4 до 20 ng/ml и у больных с РПЖ от 4 до 62 ng/ml. У 232 больных с показателем уровня ПСА более 4 ng/ml цитологически диагностирован РПЖ в материале ТПБ у 178 (76,7%) больных и у 54 (23,3%) ДГПЖ. ТПБ осуществляли с помощью биопсийного устройства Magnum (BARD, США) иглами 18-го калибра.

Результаты исследования. По данным анализа морфологической дифференцировки, у больных РПЖ в зависимости от показателя уровня показателя ПСА наблюдается следующая зависимость. При показателе уровня ПСА

от 4 до 10 ng/ml у 57 (52,8%) больных диагностирован РПЖ и у 51 (47,2%) больного ДГПЖ. При показателе уровня ПСА от 10 до 20 ng/ml у 68 (95,8%) диагностирован РПЖ и у трех (4,2%) больных ДГПЖ. У 53 (100%) больных диагностирован РПЖ при показателе уровня ПСА более 20 ng/ml. Цитологически диагностированы высокодифференцированная аденокарцинома (ВДА) у 54 (30,3%), умеренно дифференцированная аденокарцинома (УДА) у 71 (39,9%), низкодифференцированная аденокарцинома (НДА) — у 53 (29,8%). У больных с показателем уровня ПСА от 4 до 10 ng/ml были выявлены диплоидные опухоли (54,5%) и анеуплоидные опухоли (45,5%). У больных при показателе уровня ПСА от 10 до 20 ng/ml анеуплоидные опухоли составили 85,7%, при показателе уровня ПСА более 20 ng/ml диплоидные опухоли выявлены у 11,8% больных, заметно увеличилось число пациентов (88,2%) с анеуплоидным РПЖ. Отмечена высокая выживаемость у больных с показателем уровня ПСА от 4 до 10 ng/ml. У этих больных наилучшие прогностические факторы: невысокий уровень ПСА, высокая степень дифференцировки РПЖ, преобладали диплоидные опухоли, ранние стадии Т1 и Т2 составляли 74,7% больных. Выявленные распространенные процессы с показателем уровня ПСА более 20 ng/ml в стадии Т3 и Т4, а также выявленная низкая дифференцировка аденокарциномы и увеличение пациентов с анеуплоидными опухолями явились показателем низкой выживаемости у этой группы больных.

Выводы. При РПЖ показатель уровня ПСА коррелировал с классическими клинико-морфологическими факторами прогноза, такими как степень морфологической дифференцировки клеток опухоли, плоидность опухолевых клеток и стадия заболевания. По мере повышения показателя уровня ПСА наблюдается тенденция к снижению степени морфологической дифференцировки РПЖ и частоты анеуплоидных опухолей. Своевременная диагностика ранних стадий рака предстательной железы с помощью ПСА позволяет провести правильный отбор больных для достижения эффективного лечебного успеха, что способствует большей продолжительности жизни больных.

Молекулярно-генетические факторы в выборе тактики лечения злокачественных новообразований

Н. Е. Торопова, Е. В. Закамова, А. Е. Орлов

ГБУЗ «Самарский областной клинический онкологический диспансер», г. Самара

Molecular-genetic factors in choice of tactics of treatment of malignant tumors

N. E. Toropova, E. V. Zakamova, A. E. Orlov
The Samara Regional Clinical Cancer Centre, Samara, Russia

В настоящее время мутации ключевых генов клетки, регулирующих процессы дифференцировки и пролиферации, рассматриваются как генетические маркеры заболевания, а их белковые продукты как мишени направленной терапии. Герминальные мутации BRCA1, BRCA2. Гены BRCA являются классическими опухолевыми супрессорами, которые участвуют в репарации разрывов ДНК и пода-

влияют пролиферацию эстроген-зависимых клеток. BRCA-мутации увеличивают риск развития рака молочной железы (PMЖ) и рака яичника (РЯ). Характерные особенности BRCA1-ассоциированного PMЖ являются: молодой возраст больных; билатерный PMЖ или PMЖ и рак яичника; высокая частота первично-множественного рака (ПМР); отсутствие гормональных рецепторов и HER2 в опухолевых клетках, то есть триплетнегативный рак молочной железы (ТНPMЖ); высокая степень злокачественности. В «Практических рекомендациях RUSSCO» в разделе «Первичное обследование» отмечено, что «до всех видов лечебных воздействий... должно быть проведено определение рецепторов эстрогенов (РЭ) и прогестерона (РП), HER2, Ki67 и генетическое обследование (мутации BRCA) при отягощенном наследственном анамнезе, и у лиц молодого возраста...». Разработана молекулярно-генетическая классификация PMЖ. Работы Шарля Перо и Терезы Солье были пионерскими и положили начало дальнейшему изучению молекулярного портрета PMЖ. Если обобщить хорошо известные данные, можно представить схемы лечебного воздействия с учетом молекулярных рецепторных мишеней ER, PR, HER-2. Люминальный тип А и тип В с экспрессией рецепторов эстрогенов и прогестерона чувствителен к гормонотерапии, с гиперэкспрессией эпидермального фактора роста второго типа (HER-2) — к антителам-блокаторам этого рецептора трастузумабу. Нелюминальный тип с гиперэкспрессией HER2 чувствителен к трастузумабу или ингибитору тирозинкиназного домена этого рецептора — лапатинибу. Пациентки с триплетнегативным PMЖ — кандидаты на химиотерапию. Проведенные нами исследования показали, что герминальные мутации BRCA обнаруживаются у 3% больных PMЖ, пролеченных в нашем диспансере. Средний возраст больных 38 лет, практически у всех триплетнегативный рак. Подавляющая часть обнаруженных мутаций BRCA инсерции 5382. Шесть из десяти больных BRCA-ассоциированным PMЖ имели первично-множественный рак, включая контралатеральный PMЖ и синхронный билатеральный с мультифокальным ростом. Все пациентки с метакронным и синхронным PMЖ имели триплетнегативный тип с инсерцией 5382. Изучается чувствительность к платино-содержащей химиотерапии при BRCA-ассоциированных метастатических опухолях. Соединения платины вызывают двунитевые разрывы ДНК и в клетках с нарушенной репарацией ДНК — это направление к ее гибели. Иггибиторы PARP (поли (АДФ-рибоза) полимеразы) блокируют путь репарации одонитевого разрыва ДНК и приводят к апоптозу в BRCA-дефицитных опухолевых клетках, которые уже имеют дефицит в гомологичной репарации. В 80% случаев наследственный PMЖ является триплетнегативным. Мы не нашли четких рекомендаций по лечению больных наследственным PMЖ с экспрессией рецепторов гормонов и факторов роста второго типа. Анализируя литературу, мы пришли к выводу, что большинство авторов используют те же лечебные подходы к BRCA-ассоциированным ракам, что и к спорадическим. Соматические мутации. Гены сигнальных каскадов — ключевые гены, мутации в которых индуцируют канцерогенез. Первым из них является ген рецептора эпидермального фактора роста EGFR. В норме EGFR воспри-

нимает активирующие сигналы и передает их по сигнальным каскадам к ядру, инициируя пролиферацию. Мутации EGFR приводят к неконтролируемой пролиферации. Наличие мутаций связано с более поздними стадиями заболевания. Чаще всего мутации EGFR выявляются при раке легкого. С точки зрения генетической структуры, выделяют две группы HNPJ, одна из которых с аномалиями генов EGFR, ALK, RAF, ROS1, RET. Основной идеей при создании таргетных препаратов стала попытка блокировать рецептор эпидермального фактора роста, а вернее, его тирозинкиназный домен, который имеет высокую частоту мутаций при немелкоклеточном раке легкого (HNPJ). От 50 до 90% больных аденокарциномой легкого с мутацией EGFR хорошо отвечают на терапию ингибиторами тирозинкиназы (ТК) EGFR гефитинибом и эрлотинибом и получают больше пользы, чем от химиотерапии. Показана эффективность афатиниба — нового блокатора рецепторов семейства EGFR. Выявление соматических мутаций в гене EGFR рекомендовано ESMO, ASCO, NCCN, RUSSCO и является показанием к применению ингибиторов ТК. 90% обнаруженных мутаций в EGFR при HNPJ встречаются в 19-м и в 21-м экзоне. Нами проанализированы 27 образцов немелкоклеточного рака легкого, в пяти из них обнаружили мутации EGFR, во всех случаях это делеции в 19-м экзоне. Материалом служили парафиновые блоки, цитологический материал и плевральная жидкость. Итак, если в опухоли обнаружены мутации в 18–21-м экзоне, она должна быть чувствительна к гефитинибу, эрлотинибу, афатинибу. При изолированной мутации Т 790М у больных развивается резистентность к гефитинибу и эрлотинибу, но чувствительность к афатинибу сохраняется. Ингибиторы ТК эффективны только при мутациях EGFR, а если в опухоли дикий тип EGFR? В этом случае необходимо образец исследовать на наличие инверсии ALK. ALK — рецепторная ТК из семейства инсулинзависимых рецепторов. Основные сигнальные пути те же, что участвуют в передаче сигнала от EGFR. После инверсии ALK переходит в активное состояние, инициируя бесконтрольную пролиферацию. Для исключения активированной ТК ALK разработан кризотиниб, активность которого в группе больных HNPJ с инверсией ALK сопоставима с активностью гефитиниба и эрлотиниба у больных с мутациями EGFR. Если мутации EGFR и инверсия ALK не обнаружены, необходимо продолжить поиски мутаций в генах сигнальных каскадов от рецептора EGFR, ближайшие — гены семейства RAS. У больных плоскоклеточным раком легкого встречаются мутации в 12-м и 13-м кодонах гена KRAS в 18–30%. Ингибиторы EGFR у больных с конкурирующей мутацией неэффективны. Прямые таргетные препараты, воздействующие на мутантный протеин KRAS, отсутствуют, у пациентов нет возможности получать соответствующую таргетную терапию. Если мутации в гене KRAS не обнаружены, рекомендуется исследовать мутации гена BRAF в сигнальном каскаде, киназы BRAF стоят ниже. Значение мутаций гена BRAF при HNPJ стали изучать относительно недавно. Мутации обнаруживаются в основном у пациентов с аденокарциномой, чаще всего в 600-м кодоне с заменой валина на глутаминовую кислоту. BRAF-мутированные опухоли резистентны к блокаторам EGFR. Изучается эффективность

ингибиторов BRAF-киназ (Дабрафениба) при диссеминированном НМРЛ. При отсутствии мутаций EGFR, BRAF и отсутствии инверсии ALK больным НМРЛ рекомендована химиотерапия с подключением бевацизумаба или без него. Для 15% НМРЛ характерны также мутации HER2, PI3K, MEK1, транслокации с участием генов RET, ROS и др. В последние годы опубликованы работы, в которых предлагается новая генетическая классификация колоректального рака (КРР) с учетом молекулярно-генетического профиля КРР. В КРР ген EGFR не мутирован. В клетках КРР наблюдается гиперэкспрессия этого рецептора за счет амплификации гена, но эффект тот же: бесконтрольная пролиферация. Ген EGFR при КРР не исследуют, для лечения метастатического КРР используются блокаторы внеклеточного домена рецептора на основе моноклональных антител (цетуксимаб и панитумумаб). Однако если в генах сигнальных каскадов этого рецептора возникают мутации, то использовать антиEGFR-антитела нельзя. В настоящее время исследование мутационного статуса генов KRAS и NRAS (2, 3, 4 экзоны) кодонами 12, 13, 61, 146 является обязательным для выбора первой линии терапии при лечении метастатического КРР. При мКРР мутации гена KRAS встречаются до 40%, а гена NRAS — до 5%. Мы проанализировали 194 образца опухолевой ткани больных метастатическим КРР. Мутации генов RAS были обнаружены в 53% образцов опухолей. Нами было установлено, что у больных с высокими уровнями онкомаркеров чаще встречаются типы мутаций с заменой глицина на валин и глицина на цистеин в 12-м кодоне; чаще встречаются две мутации в одном кодоне. Если обнаружен дикий тип KRAS и NRAS в опухоли, то необходимо исключить конкурирующие активирующие мутации BRAF. Активирующие мутации BRAF встречаются примерно в 5–10% опухолей толстой кишки и связаны с плохим прогнозом. Если одна из пяти мутаций в 600-м кодоне будет обнаружена, антитела к EGFR будут неэффективны. К формированию резистентности к анти-EGFR-терапии могут приводить активирующие мутации в генах PIK3CA и PTEN. Если в опухоли больного мКРР обнаружена одна из активирующих мутаций KRAS, NRAS, BRAF, в качестве таргетного препарата может быть использован только бевацизумаб. Хорошо известен феномен взаимной несовместимости мутаций генов EGFR, KRAS и BRAF. Однако после проведения эффективной лекарственной терапии молекулярно-генетический профиль опухоли у пациентов с диссеминированным КРР может трансформироваться. Растет количество работ, указывающих на обнаружение мутаций EGFR и KRAS у больных с подтвержденным немутантным статусом KRAS. Для индивидуализации второй линии ХТ необходимо повторно брать биопсийный материал. Итак, больным метастатическим колоректальным раком с диким типом генов семейства RAS и BRAF могут помочь антиEGFR-антитела, с мутированным KRAS и NRAS терапия анти-EGFR-антителами противопоказана, а опухоли с мутированным BRAF резистентны к анти-EGFR-терапии. В последних случаях остается надеяться на бевацизумаб. В недалеком будущем анализ молекулярно-биологических маркеров займет одно из ведущих мест в определении лечебной тактики пациентов с онкологическими заболеваниями.

Иммунофенотипическая характеристика субклона циркулирующих опухолевых плазматических клеток при множественной миеломе

Ю. Ю. Чуксина, К. А. Белоусов, С. В. Шевелев,
В. В. Яздовский, А. К. Голенков

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского», г. Москва

Immunophenotypic characterization of subclone of circulating neoplastic plasma cells in multiple myeloma

Yu. Yu. Chuksina, K. A. Belousov, S. V. Shevelev, V. V. Yazdovsky,
A. K. Golenkov

The Moscow Regional Scientific and Research Clinical Institute n. a. M. F. Vladimirovsky, Moscow, Russia

Введение. Прогресс в технологии проточной цитометрии привел к значительному совершенствованию иммунофенотипических исследований плазматических клеток при множественной миеломе (ПК ММ), которые позволили открыть существование различающихся функциональных субклонов. Одним из примеров таких субклонов служат циркулирующие опухолевые клетки множественной миеломы (ЦОК ММ). Установлено, что ЦОК присутствуют в подавляющем большинстве случаев у больных ММ (80%), а также примерно в 20% «тлеющих» процессов и моноклональной гаммапатии неопределенного значения (B. Paiva et al., Blood, 2013). Как следствие геномной и транскрипционной гетерогенности, различаются и профили иммунофенотипической экспрессии клональных ПК ММ. Уже установлены корреляции различных исходов и различных возможных цитогенетических нарушений с наличием или отсутствием различных антигенов. Изучение иммунофенотипического профиля субклона ЦОК ММ в сравнении с клональными плазматическими клетками костного мозга (ПК КМ) позволит прогнозировать особенности течения заболевания, найти новые патогенетические подходы к индивидуализации терапии пациентов.

Цель исследования. Изучение иммунофенотипического профиля опухолевых плазматических клеток костного мозга и ЦОК ММ в сопоставлении с клиническими особенностями заболевания у больных ММ.

Материалы и методы. Параллельное иммунофенотипическое исследование проб костного мозга и ПК проведено 19 пациентам ММ методом четырехцветной лазерной проточной цитометрии (двухлазерный проточный цитофлюориметр FACSCalibur, Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения CellQuest. 14 пациентов имели впервые диагностированную ММ, пять пациентов были выявлены ранее и оказались резистентны к предшествующим режимам терапии. Возраст пациентов варьировал от 30 до 80 лет. 100% пациентов имели III стадию заболевания. У четырех (21%) пациентов выявлена плазмоцитома грудной стенки (три пациента) и угла нижней челюсти (один пациент). Протеинурия Бенс-Джонса выявлена у 11 (58%) больных. Деструкция костной системы, переломы — у шести (32%) пациентов. Миеломная нефропатия — у трех больных (16%). Выделение опухолевых ПК проводилось из гейта CD38++ / SSC и CD38++ / CD138+, в анализ включались не менее

500 тысяч событий. Определялась экспрессия антигенов CD56, CD19, CD20, CD79b, CD81, CD11c, CD33, CD28, CD27, CD117. Выбор исследуемых молекул определялся их известной патогенетической ролью: так, адгезия ПК ММ к внеклеточному матриксу костного мозга с помощью адгезивных молекул (CD11c, CD56, CD138, CD33) локализует опухолевые клетки в костномозговом окружении. Синдекан-1 (CD138) регулирует рост и выживаемость опухолевых клеток, адгезия миеломных клеток через синдекан-1 к коллагену активирует матриксную металлопротеиназу-1, способствуя резорбции костей и инвазии опухоли. Критерием позитивности считали наличие экспрессии антигена на поверхности более чем 20 % опухолевых клеток. Оценка интенсивности экспрессии антигенов проводилась по параметру средней интенсивности флюоресценции Mean Fluorescence Intensity (MFI), выраженной в условных единицах (у.е.).

Результаты. При впервые диагностированной множественной миеломе в большинстве наблюдений выявлена яркая позитивная экспрессия таких маркеров, как CD56, CD81, CD27, CD79b как на опухолевых ПК КМ, так и на ЦОК ММ, но статистически значимым ($p = 0,0478$) оказалось увеличение числа наблюдений с позитивной экспрессией молекул интегрина CD11c на ЦОК ММ по сравнению с клональными клетками КМ. По сравнению с клональными плазматическими клетками костного мозга, при иммунофенотипировании ЦОК ММ выявлено: достоверное ($p < 0,05$) снижение экспрессии CD38+ bright; достоверное ($p < 0,01$) снижение содержания клеток, коэкспрессирующих CD38++ / CD138+ и увеличение ($p < 0,05$) содержания популяции клеток с фенотипом CD38++CD138-; статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение количества клеток, экспрессирующих интегрин CD11c; статистически значимое ($p < 0,001$) снижение числа клеток, экспрессирующих молекулы адгезии CD33. Выявлено преобладание негативной / слабой экспрессии CD45 neg/dim на ПК КМ и преобладание позитивной яркой (bright) экспрессии данного маркера на ЦОК ММ, что характерно как для первичных, так и для предлеченных пациентов с ММ. Этот факт свидетельствует о том, что в циркуляцию из костного мозга выходят менее «зрелые» опухолевые плазматические клетки. Не было выявлено достоверных различий в экспрессии других маркеров, связанных с созреванием, таких как CD19, CD20, CD27 и CD79b. Уровень экспрессии тетраспонины (CD81), который ассоциируется с повышением индекса пролиферации при ММ, был одинаково высоким как на ПК КМ, так и на ЦОК ММ. Позитивная экспрессия рецептора фактора стволовых клеток CD117 отмечалась в двух наблюдениях: в дебюте на ПК КМ у пациентки с плазмоцитомой угла нижней челюсти, у которой в процессе терапии зафиксировано прогрессирование заболевания в виде локального роста опухоли (увеличения плазмоцитомы), а также у одного пациента при развитии рецидива ММ, при отсутствии CD117+ ПК КМ в дебюте заболевания.

Выводы. Миеломные ЦОК имеют уникальный иммунофенотипический профиль экспрессии белков. Иммунофенотипирование опухолевых ПК КМ до начала терапии позволяет выявить экспрессию антигенов,

характеризующих индивидуальные особенности опухолевого клона конкретного пациента. Субклон ЦОК при ММ имеет менее «зрелый» фенотип, характеризующийся более низким уровнем экспрессии синдекана-1 (CD138), молекул адгезии CD33, более высоким уровнем экспрессии CD45, повышенным уровнем экспрессии интегринов CD11c. Наличие в циркуляции субклона опухолевых ПК, экспрессирующих молекулы CD11c, может свидетельствовать о диссеминации патологического процесса. Можно предположить, что ЦОК представляет фенотипическое подмножество миеломных ПК в КМ с более низким уровнем экспрессии молекул адгезии и, как следствие, менее выраженную зависимость от ниш стромальных клеток КМ, что повышает их способность выходить в периферическую кровь и вызывать поздние (экстрамедуллярные) поражения.

V. Современная лабораторная диагностика инфекционных заболеваний

Применение иммунного блоттинга в диагностике цитомегаловирусной инфекции

А. С. Авдонина

ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская область

Use of immune blotting in diagnosis of cytomegalovirus infection

A. S. Avdonina

ECOLab Co., Elektrogorsk, Moscow Region

В связи с широким распространением цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) все более важным встает вопрос дифференциальной диагностики данного заболевания. При этом крайне важно определить не только наличие вируса в организме, но и установить стадию заболевания. Важным моментом является выявление специфических антител классов М и G к отдельным антигенам ЦМВ, позволяющее отслеживать динамику смены белков в ходе инфекционного процесса, что имеет важное диагностическое и прогностическое значение.

Цель. Разработка и оценка эффективности применения иммуноферментной тест-системы для выявления и подтверждения наличия антител классов М и G к индивидуальным белкам цитомегаловируса человека методом иммунного блоттинга.

Задачи. В ходе разработки тест-системы были решены задачи по подбору условий культивирования цитомегаловируса штамма AD-169 и получению ультразвукового лизатного антигена; отработке получения иммуносорбента; подбору состава реагентов для проведения анализа; отработке постановки иммуноферментного анализа; оценке чувствительности и специфичности разработанной тест-системы на сыворотках стандартных панелей; апробации тест-системы на клиническом материале.

Материалы и методы. При разработке тест-системы использовали электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, электроперенос разделенных белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану (блоттинг), выявление белков с помощью иммуноферментного анализа.

Результаты. Разработана тест-система для выявления антител классов М и G к отдельным антигенам цитомегаловируса методом иммунного блоттинга в формате Western Blot — «ИФА-Блот-ЦМВ-IgM/IgG». По результатам испытаний, проведенных с использованием сывороток стандартных панелей, новая тест-система имеет диагностическую эффективность, не уступающую эффективности своего аналога — тест-системы Anti-CMV — Western Blot (IgM/IgG) (Euroimmun AG, Германия). Разработаны рекомендации по интерпретации полученных результатов и применению иммуноблота в диагностике цитомегаловирусной инфекции.

Выводы. Разработанная тест-система «ИФА-Блот-ЦМВ-IgM/IgG» рекомендуется к применению в качестве подтверждающего и дифференцирующего теста при обследовании на цитомегаловирусную инфекцию.

Андрофлор® — новый метод диагностики заболеваний уrogenитального тракта мужчин

М. Н. Болдырева, И. С. Галкина

ЗАО «Научно-производственная фирма «ДНК-технология», г. Москва

Androflor® — new diagnostic method for male urogenital tract diseases

M. N. Boldyreva, I. S. Galkina
DNA-Technology Co., Moscow, Russia

Болезни мочеполовой системы — одна из ведущих причин нарушения репродуктивной функции у мужчин, что имеет важное социально-экономическое значение, особенно в современных условиях снижения рождаемости в стране. Наиболее частой причиной заболеваний является инфекционно-воспалительный процесс, развивающийся в любом из биотопов уrogenитального тракта. Современные особенности течения инфекционно-воспалительных процессов заключаются в отсутствии патогномоничных признаков болезней, вызванных патогенами и широким перечнем условно-патогенной микрофлоры, и стертой клинической картине, что делает невозможной постановку этиологического диагноза на основании клинико-анамнестических данных, требует привлечения лабораторных методов исследования. Практический интерес представляет быстрая количественная диагностика микроорганизмов, связанных с развитием заболеваний уrogenитального тракта мужчин, в том числе не поддающихся идентификации традиционными методами.

Цель. Разработка и клиническая валидация нового способа количественного исследования микрофлоры уrogenитального тракта мужчин (Андрофлор®, Андрофлор® Скрин) для диагностики острых и хронических заболеваний методом ПЦР в реальном времени.

Материалы и методы. Для решения поставленных задач на основе данных мировой литературы был составлен список диагностируемых микроорганизмов, в который

вошли представители нормобиоты мочеполового тракта мужчин и наиболее частые возбудители инфекционно-воспалительных заболеваний (табл. 1). В основе анализа лежит количественная идентификация данных микроорганизмов при помощи технологии ПЦР в реальном времени. Применение молекулярно-генетического анализа имеет ряд преимуществ перед культуральными микробиологическими методами: значительно менее жесткие требования к преаналитическому этапу, меньший риск влияния на результат исследования контаминации образцов микроорганизмами из внешней среды, равные условия по чувствительности и специфичности для всех микроорганизмов, в том числе некультивируемых и труднокультивируемых, которые предполагается диагностировать, а также высокая скорость получения результата (несколько часов). С учетом клинико-экономических аспектов было разработано новое технологическое решение: групповая идентификация микроорганизмов и мультиплексный анализ.

Варианты комплектации «Набора реагентов для исследования микрофлоры уrogenитального тракта мужчин методом ПЦР в режиме реального времени Андрофлор®»

Показатель	Андрофлор®	Андрофлор® Скрин
Геномная ДНК человека	+	+
Общая бактериальная масса	+	+
<i>Lactobacillus</i> spp.	+	+
<i>Staphylococcus</i> spp.	+	+
<i>Streptococcus</i> spp.	+	+
<i>Corynebacterium</i> spp.	+	+
<i>Gardnerella vaginalis</i>	+	+
<i>Atopobium</i> cluster	+	—
<i>Megasphaera</i> spp. / <i>Veillonella</i> spp. / <i>Dialister</i> spp.	+	—
<i>Sneathia</i> spp. / <i>Leptotrichia</i> spp. / <i>Fusobacterium</i> spp.	+	—
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	+	+
<i>Ureaplasma parvum</i>	+	+
<i>Mycoplasma hominis</i>	+	+
<i>Bacteroides</i> spp. / <i>Porphyromonas</i> spp. / <i>Prevotella</i> spp.	+	—
<i>Anaerococcus</i> spp.	+	—
<i>Peptostreptococcus</i> spp. / <i>Parvimonas</i> spp., <i>Eubacterium</i> spp.	+	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Ralstonia</i> spp. / <i>Burkholderia</i> spp.	+	—
<i>Haemophilus</i> spp.	+	—
<i>Enterobacteriaceae</i> spp. / <i>Enterococcus</i> spp.	+	+
<i>Candida</i> spp.	+	+
<i>Mycoplasma genitalium</i>	+	+
<i>Trichomonas vaginalis</i>	+	+
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	+	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	+	+

Критериями включения пациентов (n = 276) в клиническую апробацию были: 1) возраст от 19 до 50 лет; 2) предположительный диагноз — уретрит острый, уретрит хронический (обострение или вне обострения); простатит острый, простатит хронический (обострение или вне обострения). Критерии исключения: сифилис, гепатиты В, С, ВИЧ, острый или хронический пиелонефрит, острый и хронический цистит, прием антибактериальных препаратов,

системных глюкокортикостероидов, цитостатиков и иммунодепрессантов в период последних двух месяцев перед обращением к врачу. Группа сравнения: условно здоровые пациенты (n = 110). Исследуемый биоматериал: соскоб из уретры, эякулят, моча. Дополнительные исследования: микроскопия мазка и бактериологический посев на флору.

Результаты. Проведенные исследования показали, что предложенный перечень микроорганизмов позволяет в 98 % случаев описать бактериальную микрофлору урогенитального тракта условно здоровых мужчин и мужчин с клиническими признаками острых и хронических заболеваний. По сравнению с микроскопией и микробиологией используемая технология ПЦР в реальном времени показала более широкие возможности установления этиологически значимых возбудителей заболеваний урогенитального тракта, особенно среди облигатно-анаэробных бактерий, и высокую скорость получения результата анализа (до четырех часов).

Выводы. Разработанная новая технология комплексного количественного исследования микрофлоры урогенитального тракта мужчин Андрофлор® методом ПЦР в режиме реального времени позволяет расширить возможности и увеличить скорость этиологической диагностики инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе хронических, рецидивирующих форм, что может быть использовано в практическом здравоохранении для обоснованного выбора тактики ведения пациентов, при обследовании бесплодных пар и решения других прикладных задач.

Новые возможности диагностики пневмоний: быстрые антигенные тесты для этиологической расшифровки возбудителей

А. Е. Дробченко, О. Марголин

ЗАО «Биоград», г. Санкт-Петербург; Alere Inc., США

New possibilities for diagnosis of pneumonia: rapid antigenic tests for etiological decoding of pathogens

A. E. Drobchenko, O. Margolin

Biograd Co., St. Petersburg, Russia; Alere Inc., USA

Новый метод с использованием иммунохроматографических тестов «Бинакс» позволяет быстро и достоверно дифференцировать возбудителя пневмонии в моче, приобретает решающее значение для выбора тактики этиотропной терапии. Метод входит в международные стандарты диагностики, в том числе в стандарт ВОЗ, и рекомендован в России к применению. Дифференциальная диагностика пневмококковой и легионеллезной пневмонии имеет особое значение, поскольку эти инфекции, обладая схожими клиническими симптомами, требуют различных схем антибиотикотерапии. До недавнего времени полезность диагностических исследований с целью определения этиологии внебольничных пневмоний была спорной из-за отсутствия быстрого, точного и экономически эффективного метода. Достижение в исследованиях последних лет позволили создать высокочувствительные и специфичные иммунохроматографические (ИХА) тесты «Бинакс» для выявления антигенов *Legionella pneumophila*

и *Streptococcus pneumoniae* в моче пациента (патенты США № 6017767, 6548309, 6824997). Ныне экспертами ВОЗ и Европейской рабочей группой приняты стандарты, согласно которым диагноз «легионеллез» или «пневмококк» в случае острой инфекции нижних дыхательных путей считается установленным при определении растворимого антигена возбудителя в моче ИХА-методом. Согласно стандартам, утвержденным в России, для дифференциальной диагностики пневмококковой и легионеллезной пневмонии рекомендуется проводить быстрый тест, позволяющий в течение 15 минут определить антиген возбудителя в моче иммунохроматографическим методом.

Материалы и методы. Быстрые иммунохроматографические тесты «Бинакс» (Alere Inc., США) для определения антигена возбудителя в моче зарегистрированы в России и рекомендованы к применению. Данные тесты позволяют выявлять антигены *Legionella pneumophila* и *Streptococcus pneumoniae* в моче пациента. Они также предоставляют возможность определения пневмококковых менингитов при тестировании СМЖ. Метод основан на взаимодействии кроличьих антител к возбудителю, нанесенных на нитроцеллюлозную мембрану с растворимым антигеном возбудителя, выделяемым с мочой. Кроличьи антитела связаны с красителем, обеспечивающим визуализацию реакции. Состав набора Бинакс: 22 тест-кассеты в форме открывающейся книжки (в герметичной упаковке из фольги), содержащие мембрану с нанесенными иммобилизованными в виде отдельных полосок кроличьими антителами к антигену возбудителя и контрольными антителами; реагент А — один пластиковый флакон-капельница; 22 тампона на палочке для отбора образца мочи; положительный контрольный тампон, содержит термоинактивированный антиген возбудителя; отрицательный контрольный тампон. Для проведения теста тампон на палочке погружают в образец исследуемой мочи, вынимают и помещают в тест-кассету. Затем добавляют реагент А и закрывают тест-кассету книжку. Результаты учитываются спустя 15 минут и интерпретируются по наличию или отсутствию визуально различимых окрашенных линий в окне результата и в окне контроля.

Результаты. Растворимый антиген выявляется в моче больных, начиная с третьего дня болезни, и может быть обнаружен в течение нескольких последующих месяцев (до года). Чувствительность теста BinaxNOW® *Legionella Urinary Antigen* составляет 95 %, специфичность — 95 %. Чувствительность теста BinaxNOW® *Streptococcus pneumoniae Antigen* — 86 %, специфичность — 94 %. Антибиотикотерапия, начатая до проведения теста, не влияет на его результат. Для выявления пневмоний, вызванных вирусами гриппа, могут быть использованы тесты BinaxNOW® *Influenza A & B*. Инфекции преимущественно с воздушно-капельным путем передачи возбудителя, характеризующиеся поражением верхних дыхательных путей, также могут быть успешно выявлены с помощью быстрых тестов. Для выявления стрептококка группы А в экстрагирующем растворе, полученном из мазка, взятого из зева. Минздравом России рекомендован к использованию иммунохроматографический экспресс-тест BinaxNOW® *Strep A*.

Выводы. Использование экспресс-теста «Бинакс» для установления диагноза позволяет незамедлительно выбрать антибиотики узкого спектра и начать терапию с наиболее подходящего препарата. Тесты «Бинакс» одобрены FDA (Управление по пищевым продуктам и лекарственным средствам США), и в настоящее время более чем 90% случаев окончательного диагноза внебольничной пневмонии в мире устанавливается данным методом. Положительные результаты могут быть дополнены с помощью бактериологического метода.

Частота выявления гепатитов среди беременных женщин, обследованных на TORCH-инфекции

А. А. Ганина¹, К. К. Кюрегян², М. И. Михайлов²

¹ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская область;

²ФГБУН «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова», г. Москва

Detection rate of hepatitis among pregnant women screened for TORCH-infections

A. A. Ganina, K. K. Kyuregyan, M. I. Mikhaylov

ECOLab Co., Elektrogorsk, Moscow Region; the Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis n.a. M. P. Chumakov; Moscow, Russia

При активном вовлечении в эпидемиологический процесс населения репродуктивного возраста особое значение приобретает диагностика вирусных гепатитов у беременных женщин. Беременные тестируются на маркеры вирусных гепатитов трижды, в каждом триместре беременности. Такой контроль за беременной позволяет выявить бессимптомное носительство вируса. Однако обнаружение серологических маркеров вирусных гепатитов во время планового обследования у беременных женщин без клинических симптомов гепатита вызывает у них негативную реакцию и недоверие к результатам проведенного анализа, особенно если при повторных исследованиях получены противоречивые результаты.

Цель исследования. Оценка распространенности вирусных гепатитов среди беременных женщин г. Москвы и Московской области, обследованных на инфекции группы TORCH.

Методы. Проводили исследование 404 образцов сывороток крови беременных женщин на маркеры парентеральных вирусных гепатитов и инфекций группы ТОРЧ. В качестве контрольной группы использовали образцы сывороток крови от женщин-доноров крови.

Результаты. При первичном исследовании HBsAg выявлены 10 положительных образцов от беременных женщин. С помощью реакции нейтрализации удалось подтвердить девять из 10. При подтверждении пяти первично положительных результатов выявления анти-ВГС иммуноглобулины класса G ко всем антигенным эпитопам вируса удалось выявить в двух образцах от беременных женщин. В двух образцах подтвердили выявление антител только к ядерному гликопротеиду ВГС. Все вышеперечисленные образцы были положительными в аналогичных отечественных тестах на анти-ВГС, причем также только по ядерному антигену ВГС. Однако РНК удалось обнаружить только в образцах, содержащих весь спектр антител к ВГС. Один из представленных образцов не исследовался в ПЦР, так как на стадии подтверждения методом ИФА дал отрицательный результат.

Выводы. Частота выявления анти-ВГС среди беременных женщин г. Москвы составила 0,5%. Частота выявления HBsAg составила 2,2%, это примерно в 2,5 раза выше, чем в среднем по РФ. Столь высокую частоту выявления HBsAg среди беременных женщин г. Москвы и Московской области можно объяснить возрастом обследованных лиц. Всем женщинам-носителям HBsAg на момент исследования было больше 25 лет, то есть скорее всего они не попали в программу вакцинации против гепатита В. Кроме того, высока вероятность попадания в исследуемую группу мигрантов из бывших союзных республик (Таджикистан, Узбекистан, Молдова и т. д.), зарегистрировавшихся на территории г. Москвы и Московской области. Таким образом, специфичность тест-систем, использованных для исследования сывороточных маркеров парентеральных вирусных гепатитов (HBsAg и анти-ВГС) среди беременных женщин, составила 99,8 и 99,5% соответственно.

Использование метода ПЦР в диагностике инфекционного мононуклеоза

Н. И. Королева, О. В. Андриенко, Е. Н. Маленьких

ГБУЗ СК «Краевая детская клиническая больница», г. Ставрополь

Method of PCR (polymerase chain reaction) in diagnosis of infectious mononucleosis

N. I. Korolyova, O. V. Andrienko, E. N. Malen'kikh

The Regional Children's Clinical Hospital, Stavropol, Russia

Актуальным вопросом лабораторной диагностики герпесвирусных инфекций является выбор методов исследований, видов биологического материала, сроков обследований. Это позволяет не только выявлять маркеры инфекции, но и оценивать их активность, что особенно важно как при установлении диагноза, так и назначении терапии. Этиологическим фактором инфекционного мононуклеоза является вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ). Очень часто у детей раннего возраста инфекционный мононуклеоз протекает под маской острой респираторной инфекции, и они не получают противовирусной терапии. Вследствие этого формируется хроническая форма, протекающая с клиникой рецидивирующих респираторных заболеваний, имеющих лимфо-пролиферативный синдром, лимфоцитоз и, как правило, отсутствие в крови атипичных мононуклеаров. В повседневной практике чаще используется метод иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления специфических иммуноглобулинов, но этого не всегда бывает достаточно.

Цель. Определение значимости метода ПЦР у диагностически неясных больных с симптомами сходными с инфекционным мононуклеозом.

Материалы и методы. За период 2013–2014 годов нами были исследованы 250 образцов, взятых на исследование от детей с подозрением на инфекционный мононуклеоз, поступивших на стационарное лечение в ГБУЗ СК «КДКБ». Были обследованы дети в возрасте от 0 до 18 лет, из них у 40 пациентов взяли на исследование кровь, а у 210 — слюну. Для выделения ДНК и амплификации использовались наборы НПФ «ДНК-технология» (Россия). Детекция проводилась в режиме реального времени с использованием детектирующего амплификатора «ДТ-лайт».

Результаты. Установлено, что частота выявления ДНК вируса Эпштейна-Барр в пробах слюны составила 63 %, в пробах крови — 18 %. Нами был проведен сравнительный анализ частоты ПЦР-положительных результатов в зависимости от возраста. Была выделена группа детей раннего возраста до трех лет (135 человек) и вторая группа — дети от трех до 18 лет (115 человек). Как показал анализ проведенных исследований, частота выявления вируса в слюне существенно не отличалась в обеих группах, а определение ДНК в крови было выявлено только в первой группе (до трех лет) у семерых пациентов. Характерно, что у данных пациентов клинически диагноз инфекционного мононуклеоза был подтвержден методом ИФА, определением иммуноглобулинов класса М и G в плазме крови. Дальнейший анализ показал, что при типичной клинической картине заболевания выявление ДНК вируса Эпштейна-Барр в слюне регистрировалось в три раза чаще, чем при исследовании крови у одного и того же ребенка. В острый период EBV-инфекции у 100 % пациентов методом молекулярно-генетической диагностики (ПЦР) была выделена ДНК в обоих образцах (крови, слюне), у 88 % определялись а-EBV VCA IgM, у 8 % а-EBV VCA IgG. В периоде ранней реконвалесценции у 72 % ДНК EBV была выделена только в образцах слюны, а у 45 % выявлены а-EBV VCA IgM, у 61 % выявлены а-EBV VCA IgG. В периоде поздней реконвалесценции у 34 % ДНК EBV была выделена в образцах слюны, а-EBV VCA IgM не определялись вообще, а у 96 % выявлены а-EBV VCA IgG.

Выводы. Метод ПЦР можно рекомендовать как основной для постановки диагноза инфекционного мононуклеоза у диагностически неясных больных в острый период заболевания. Для установления этиологического фактора инфекционного мононуклеоза целесообразно проводить определение ДНК возбудителя в слюне и плазме пациента. Тип биологического материала для исследования необходимо выбирать из сред обитания возбудителя и фазы течения заболевания.

Универсальный аппаратно-программный комплекс «Эксперт-Лаб» для регистрации и интерпретации результатов диагностических лабораторных исследований

Н. В. Мажукин¹, С. Г. Марданлы¹, А. Е. Туголуков², С. В. Ротанов¹

¹ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская область; ²ООО «Синтеко-Комплекс», г. Москва

Universal hardware-software complex 'Expert-lab' for registration and interpretation of results of diagnostic laboratory tests

S. G. Mardanyly¹, N. V. Mazhukin¹, A. E. Tugolukov², S. V. Rotanov¹
ECOlab Co., Elektrogorsk, Moscow Region; Sinteco Complex Co., Moscow, Russia

Цель. Оптимизация программного обеспечения (ПО) аппаратно-программного комплекса (АПК) «Эксперт-Лаб» для учета и интерпретации результатов диагностических лабораторных исследований.

Материалы и методы. АПК «Эксперт-Лаб», диагностические наборы реагентов для иммуноферментного анализа (ИФА), реакций пассивной гемагглютинации (РПГА) и микропреципитации (РМП), линейного иммуноблоттинга (ЛИБ) и образцы крови больных и здоровых лиц, аттестованные по содержанию в них специфических антител.

Результаты. Данные визуального учета результатов исследований клинических образцов в РПГА, РМП и ЛИБ, а также с использованием автоматических спектрофотометров в ИФА были сопоставлены с материалами обработки результатов соответствующих тестов с применением АПК «Эксперт-Лаб». Проведенная работа позволила изменить ряд параметров ПО данного АПК, оптимизировать диагностические интервалы регистрируемых результатов для ранжирования этих показателей, соответствующих содержанию антител в образцах, в соответствии с существующими традициями (в условных единицах измерения, «плюсах», для РПГА, РМП и ЛИБ и в виде коэффициента позитивности для ИФА). Адаптация ранее использовавшегося ПО для АПК «Эксперт-Лаб» потребовала также разработки новых протоколов проведения исследования, изменения дизайнов рабочего стола и формы предоставления на бумажном носителе в зависимости от цели выполняемого лабораторного теста (скрининг специфических антител при первичном обследовании населения или полуколичественная оценка их содержания для диагностики и в период последующего динамического наблюдения).

Выводы. 1) Реализована оптимизация процесса автоматического учета и интерпретации результатов лабораторных исследований с использованием АПК «Эксперт-Лаб». 2) Внедрение в практику здравоохранения средств автоматизированного учета и интерпретации результатов исследований в РПГА, РМП и ЛИБ позволяет стандартизовать процесс проведения исследований в разных лабораториях на основании объективных оцифрованных показателей.

Зоонозные инфекции в современном обществе. Скрытые угрозы

В. А. Малов, Е. Я. Малова

ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Минздрава России, г. Москва

Zoonotic infections in modern society. Hidden threats

V. A. Malov, E. Ya. Malova
The First Moscow State Medical University n.a. I. M. Sechenov, Moscow, Russia

По общепринятому определению, к зоонозным инфекциям относятся любые инфекционные заболевания (инвазии), которые естественными путями передаются от животных к человеку. Из известных на сегодняшний день 1 410 возбудителей инфекционных заболеваний людей, 61 % имеют потенциальную зоонозную природу (Karesh W.B. et al., 2005). А из числа возбудителей т.н. «новых инфекционных заболеваний человека» (emerging human diseases) 75 % происходят из дикой природы (Brown C., 2004). Приведенные данные не могут не приниматься во внимание, когда речь идет о состоянии общественного здравоохранения и контроле за распространенностью инфекционных заболеваний.

Целью настоящей работы явилась актуализация проблемы зоонозных инфекций в современном обществе.

Феномен зоонозных инфекций и инвазий сам по себе не является новым. Многие возбудители инфекционных за-

болеваний стали постоянными спутниками человека по мере того как формировалось промышленное животноводство. О ренессансе данной проблемы заговорили относительно недавно, когда стало понятно, что многие глобальные программы, обусловленные развитием современного общества, способствуют росту численности зоонозных инфекций и инвазий и их распространенности. Проблема распространенности зоонозных инфекций представляет собой многофакторную систему, которой, в принципе, можно управлять. Ведущими компонентами данной системы являются: а) расширение границ городов и мегаполисов, следствием чего является включение в их границы природных очагов инфекций; б) учащение контактов человека с дикой средой вследствие роста туризма и путешествий; в) глобальная торговля, способствующая более широкому распространению возбудителей; г) содержание животных в домах. По мнению многих исследователей, очень высокие риски инфицирования и заболевания людей зоонозными инфекциями и инвазиями несет домашнее содержание животных (Damborg P. et al., 2015). Рынок животных, которых содержат в домашних условиях, не контролируется и не регулируется. Реальное число животных, содержащихся в домашних условиях, неизвестно. Самыми распространенными животными, которые содержатся в домах, являются кошки и собаки, которые могут быть источником широкого круга бактериальных и протозойных возбудителей зоонозных инфекций (сальмонеллы, иерсинии, кампилобактер, бартонеллы, токсоплазмы и др.). Не меньшую, а возможно, и большую опасность представляет содержание экзотических животных, которые могут служить источником редких и опасных возбудителей (Warwick C., 2011). Поскольку ветеринарные и медицинские лабораторные службы, как правило, разобщены, контролировать риски распространения зоонозных инфекций и инвазий в среде владельцев домашних животных на сегодняшний день не представляется возможным, что следует рассматривать как скрытую угрозу. Таким образом, на сегодняшний день необходима разработка объединенных программ контроля распространения инфекционных возбудителей среди животных, содержащихся в домашних условиях, представляющих опасность для здоровья человека.

Применение линейного иммуноблоттинга для лабораторной диагностики инфекций TORCH-группы

С. С. Марданлы, В. А. Арсеньева, Е. А. Амелина

ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская область

Linear immunoblotting in laboratory diagnostics of TORCH-group infections

S.S. Mardanyly, V.A. Arsenyeva, E.A. Amelina
ECOlab Co., Elektrogorsk, Moscow Region, Russia

Для обеспечения стандартов и порядка оказания медицинской помощи беременным женщинам по профилю «акушерство и гинекология» (приказ Минздрава России № 572н от 01.11.2012), а также оперативного обследования новорожденных и лиц из групп риска требуется регулярное исследование венозной крови пациентов с целью определения маркеров, свидетельствующих об инфицировании возбудителями TORCH-группы.

Цель. Разработка нового отечественного набора реагентов для одновременного выявления антител разных классов к основным антигенам возбудителей инфекций TORCH-группы.

Результаты исследования. Современные клинические лабораторные технологии мультипараметрического исследования включают линейный иммуноблоттинг, при этом иммуносорбент должен содержать несколько наиболее значимых антигенных детерминант. Разработанный формат нового отечественного набора «Лайн-Блот TORCH-профиль» представляет собой стрип из нитроцеллюлозной мембраны с нанесенными на него пятью линиями антигенов (очищенные нативные антигены *Toxoplasma gondii* и *Rubella virus* зарубежного производства, а также высокоспецифичные рекомбинантные аналоги антигенов CMV, HSV-1 и HSV-2 производства ЗАО «ЭКОлаб») и растворы, необходимые для проведения исследования (конъюгат, разводящий, субстратный и промывающий растворы, стоп-реагент). Комплектация набора № 1 предусматривает определение антител класса G, а комплектации № 2 — антител класса M. В иммуносорбент комплекта № 1 дополнительно включены рекомбинантный антиген *T. gondii* p30 (для исключения первичной инфекции за последние три месяца) и контроль выраженности гуморального иммунитета к краснухе (Ru-Cut off). Диагностические свойства опытно-экспериментальных серий нового набора изучены в сравнительных испытаниях по отношению к результатам в ИФА с наборами, разрешенными к применению в России. Исследованы 1115 образцов из состава стандартных панелей сывороток отечественных производителей, а также клинических образцов крови. Была установлена высокая диагностическая эффективность нового набора в комплектации № 1 (98,5%) и № 2 (72%). При противоречивых результатах в иммуноблоттинге и ИФА сыворотки дополнительно изучались с реагентами зарубежного производства (Recomline TORCH Screening, Германия), и было получено полное совпадение результатов исследования с новым набором.

Заключение. Новый отечественный набор реагентов «Лайн-Блот TORCH-профиль» завершает процедуру государственной регистрации в России и может быть рекомендован для скрининга населения по показателю инфицирования возбудителями TORCH-группы.

Прогностические параметры при формировании длительно протекающей уrogenитальной гонореи

Е. А. Михайлова¹, А. Ю. Миронов², О. О. Жеребятёва¹

¹ГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Оренбург; ²ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, г. Москва

Prognostic parameters in formation of long-flowing urogenital gonorrhea

E. A. Mikhailova¹, A. Yu. Mironov², O. O. Zherebyateva¹

¹The Orenburg State Medical University, Orenburg; ²the Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology n.a. G.N. Gabrichevsky, Moscow; Russia

Цель. Выявить микробиологические и иммунологические предикторы формирования осложненных форм гонококковой инфекции.

Материалы и методы. Были обследованы 267 мужчин репродуктивного возраста (18–40 лет). Обследуемые были поделены на три группы: первая группа — 81 фертильный мужчина, не имеющий признаков воспалительных процессов в урогенитальном тракте и с нормальными показателями спермограммы (группа здоровых мужчин); вторая группа — 107 человек, страдающих малосимптомными хроническими гонококковыми воспалительными заболеваниями уретры (локализованная гонорея по МКБ-10); третья группа — 79 человек, страдающих малосимптомными хроническими гонококковыми воспалительными заболеваниями предстательной железы (гонорея с системными проявлениями по МКБ-10). Из эякулята обследуемых были выделены 997 штаммов аэробных и облигатно-анаэробных микроорганизмов, в том числе гонококков и грибов. Все выделенные штаммы идентифицированы традиционными методами с использованием индикаторных систем (LaChema, Чехия), (Biomerieux, Франция). Анаэробы изолировали в анаэробных средах с использованием питательных сред (Becton Dickinson, США). У штаммов микроорганизмов определяли способность деградировать мурамидазу и комплемент светооптическим методом. Измерение лактоферрина и sIgA в эякуляте проводили методом ИФА («Вектор-Бест», Новосибирск) с регистрацией результатов на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия). Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики, с использованием пакета прикладных программ Statistika Plus 2/2.

Результаты. При локализованной гонорее по сравнению со здоровыми уменьшается ПМО и изменяется видовой спектр аэробов, увеличивается ПМО грибов. Микрофлора эякулята мужчин с системными проявлениями гонореи отличается видовым разнообразием аэробов и особенно анаэробов, повышением уровня бактериоспермии до 10^5 КОЕ/мл, а кандидаспермии до 10^3 КОЕ/мл. Длительное течение гонореи сопровождается диагностически значимым увеличением в эякуляте дрожжевых грибов рода *Candida* со способностью нейтрализовывать мурамидазу и комплемент. Частым ассоциантом в урогенитальном микробиоценозе пациентов, страдающих осложненной гонореей, являются дрожжевые грибы р. *Candida*. Было оценено их возможное влияние на факторы персистенции *Neisseria gonorrhoeae*. Изучено влияние внеклеточных факторов культур грибов рода *Candida* на способность гонококков инактивировать мурамидазу и комплемент. Установлено, что метаболиты *Candida* провоцировали усиление вирулентных свойств *Neisseria gonorrhoeae* (антимурамидазную и антикомплемментарную активность). Грибы рода *Candida* вместе с тем и сами способны истощать эффекторы врожденного иммунитета макроорганизма, обладая антимурамидазной и антикомплемментарной активностью. Анализ свойств симбионтов при урогенитальной гонорее выявил информативные критерии прогнозирования исхода гонококковой инфекции и позволил установить их числовые параметры. Так, если грибы высевались вместе с гонококком из эякулята больных, и при этом титр их был не ниже 10^2 КОЕ/мл, и штаммы непременно обладали антимурамидазной (не ниже 1,3 мкг/мл ОП) и антикомплемментарной (не ниже $1,5 \times 10^2$ антилитических единиц комплемента)

одновременно, то предполагается длительное течение гонококковой инфекции. Способ запатентован (патент РФ № 2332671). Оценка мукозального иммунитета, проведенная при исследовании секрета урогенитального тракта пациентов с отличающимися по распространенности формами гонококковой инфекции, позволила предложить критерии дифференциации гонореи при ее латентном течении, основанные на определении иммунологических показателей эякулята — sIgA и лактоферрина. При одновременном уровне sIgA не больше 2,51 мкг/мл и концентрации лактоферрина не меньше 6965 нг/мл гонококковая инфекция диагностировалась как распространенная, а при несоблюдении этих параметров инфекция расценивалась как локализованная. Способ запатентован (Патент РФ № 2400754).

Выводы. Испытания предложенных способов проводились клинически, и их результаты позволили заключить, что методы информативны и могут быть пригодны для широкого применения в практике.

Диагностическая значимость неопределенных результатов исследования антител к вирусу гепатита С

А. А. Потапова¹, Т. А. Туполева², Е. Н. Овчинникова², М. М. Шульгина¹, М. И. Ермолаева¹, Е. В. Ефремова¹, Н. И. Сюч¹

¹ГБУЗ г. Москвы «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения г. Москвы; ²ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, г. Москва

Diagnostic importance of indeterminate results of antibodies to hepatitis C virus researches

A. A. Potapova¹, T. A. Tupoleva², E. N. Ovchinnikova², M. M. Shulgina¹, M. I. Ermolaeva¹, E. V. Efremova¹, N. I. Syuch¹

¹The Moscow Scientific and Practical Centre for Dermatology and Venereology and Cosmetology; ²the Research Centre for Hematology; Moscow, Russia

Целью представленной работы являлось установление диагностической значимости неопределенных результатов исследования маркеров вирусного гепатита С для повышения качества клинико-лабораторной диагностики инфекции на этапе первичного скрининга антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС).

Материалы и методы. Материалом исследования были пробы сыворотки крови пациентов различных лечебно-профилактических учреждений г. Москвы, направленные на исследование анти-ВГС. Для определения количества противоречивых результатов исследования в разных иммуноферментных системах планшетного формата и иммуноблотах исследованы пробы сыворотки крови 264 пациентов различных ЛПУ, в том числе 161 женщины и 103 мужчин (средний возраст $44,3 \pm 1,3$ года, здесь и далее $M \pm m$). Разработка алгоритма обследования пациентов проведена на основании более чем тысячи исследований проб 117 пациентов (средний возраст $50,5 \pm 1,9$ года) с низкими положительными результатами в иммуноферментных тест-системах (ИФТС) планшетного формата и линейном иммунном анализе (ЛИА). По результатам исследований в ИФТС вычисляли коэффициент позитивности пробы (КП). Наличие РНК исследовано методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени и методом электрофореза в геле в пробах сыво-

ротки крови с неопределенными и противоречивыми результатами определения анти-ВГС (85 пациентов, средний возраст $51,5 \pm 2,87$ года). 140 образцов сыворотки крови пациентов (средний возраст $51,9 \pm 2,5$ года) были исследованы на наличие анти-ВГС класса G и антител класса M в экспериментальной серии иммуночипов производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Концентрацию α -фетопротеина (АФП) в иммуноферментном анализе определяли в 65 пробах сыворотки крови мужчин в возрасте от 17 до 60 лет (средний возраст $33,6 \pm 12,9$ года), в 56 образцах сыворотки крови женщин в первом триместре беременности (8–10 недель), в 88 образцах сыворотки крови пациентов старше 60 лет (возраст от 60 до 93 лет, средний возраст $74,0 \pm 6,5$ года).

Полученные результаты. Сопоставлены результаты подтверждения наличия анти-ВГС в двух подтверждающих ИФТС с раздельным выявлением антител к Core-антигену (анти-Core) и к комплексу NS-антигенов (анти-NS) разных производителей. При тестировании 144 проб сыворотки крови с позитивными результатами в ИФТС «РеккомбиБест анти-ВГС подтверждающий тест» вследствие выявления реактивности только к комплексу NS-белков (КП $2,35 \pm 2,45$) в подтверждающей ИФТС «ДС-ИФА-АНТИ-HCV-СПЕКТР-GM» 32 пробы (22,22 %) были анти-ВГС-отрицательными. Из этих 32 образцов, протестированных с помощью INNO-LIA HCV Ab III update, неопределенные результаты в ЛИА были получены для 11 образцов (34,4 %), анти-ВГС в ЛИА были обнаружены в девяти образцах (28,1 %) и не обнаружены в 12 образцах (37,5 %). При сравнении частоты отрицательных результатов в ЛИА разницы в специфичности подтверждающих диагностических систем планшетного формата не обнаружено. Принцип дополнительного исследования в ИФТС разных производителей был использован при разработке алгоритма дополнительного тестирования проб с низкими положительными результатами с разработкой критериев для выбора в дополнительное исследование проб с КП анти-Core < 2 и КП анти-NS < 3. Был предложен также упрощенный алгоритм тестирования низкопозитивных проб, в котором в качестве референсных включены ИФТС с раздельным определением антител к анти-Core, анти-NS3, анти-NS4 и анти-NS5, содержащие критерии неопределенного результата. Использование метода ПЦР для верификации наличия ВГС-инфекции у пациентов с проблемами выявления антител (но без наличия иммунодефицитных состояний) оказалось эффективным при некоторых условиях. А именно, РНК ВГС выявляется в части образцов сыворотки крови с неопределенными результатами исследования анти-ВГС в ИФА, обусловленными выявлением антител только к NS3 антигену ВГС с КП > 3. В пробах с неопределенными результатами исследования анти-ВГС вследствие определения в ИФА только анти-NS4 при чувствительности метода ПЦР 50 МЕ/мл РНК ВГС не обнаружена. При использовании ПЦР для исследования проб с неопределенными результатами исследования анти-ВГС в ИФТС и в ЛИА, но позитивными в иммуночипах по наличию специфических иммуноглобулинов класса M, в некоторых образцах наблюдалась типичная картина кривой накопления продуктов реакции

ПЦР, не выходящая, однако, на критический уровень. Не исключено, что при совершенствовании методов выделения РНК ВГС наличие генетического материала будет подтверждаться в большем количестве проб с неопределенными результатами исследования анти-ВГС в ИФА и в ИБ. При исследовании концентрации АФП обнаружено, что при наличии анти-ВГС она увеличена у мужчин моложе 60 лет (в 2,9 раза) и женщин в первом триместре беременности (в 2,6 раза) с антителами к ВГС. При неопределенных результатах исследования анти-ВГС концентрация АФП в данных группах увеличена соответственно в 1,7 и 1,95 раза. Увеличение концентрации АФП характерно для проб с антителами к Core или к NS3, но не к NS4 антигенам ВГС.

Выводы. При неопределенных результатах исследования анти-ВГС, обусловленных выявлением только антител к Core или к комплексу NS антигенов ВГС, для предупреждения сообщения ложно-позитивного результата пробы с КП анти-Core < 2 или с КП анти-NS < 3 необходимо исследовать в ИФТС другого производителя и (или) в ИФТС «спектр». В пробах сыворотки крови пациентов с неопределенными результатами исследования анти-ВГС вследствие обнаружения только анти-NS3 с КП ≥ 3 выявляется РНК ВГС. В пробах сыворотки крови пациентов с реактивностью антител только к NS4 антигену ВГС при чувствительности метода ПЦР 50 МЕ/мл РНК ВГС не выявляется. Повышение концентрации АФП у пациентов моложе 60 лет наблюдается не только в случае положительного, но и неопределенного результата исследования анти-ВГС.

Модификация выпуска кардиолипидного антигена для диагностики сифилиса

С. В. Ротанов, С. Г. Марданлы, Е. А. Амелина, Н. В. Бахилина, И. А. Ермолаева

ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская область

Modification of release of causative agent antigen to diagnose syphilis

S. V. Rotanov, S. G. Mardanly, E. A. Amelins, N. V. Bahilina, I. A. Ermolaeva

ECOLab Co., Elektrogorsk, Moscow Region, Russia

Нетрепонеменные лабораторные тесты с кардиолипидным антигеном (Аг Кл) в настоящее время широко применяются при обследовании больных сифилисом для определения активности течения инфекционного процесса или в качестве критерия оценки эффективности проведенной антибактериальной терапии. При этом Аг Кл, используемый в реакции микропреципитации (РМП), выпускается в составе наборов реагентов виде спиртового концентрата, из которого в клинических лабораториях медицинских учреждений готовят рабочую взвесь. Рабочая взвесь Аг Кл, приготовленная в разных лабораториях, может существенно различаться по своей специфической активности и используется в течение короткого времени хранения.

Цель работы. Модернизация состава и методики приготовления Аг Кл для РМП с целью его производственного выпуска в виде готового к применению реагента длительного хранения.

Результаты исследования. Решение проблемы состояло в разработке состава стабилизирующих и консервирующих добавок к приготовленной взвеси Ag Кл (мертиолят или тимеросал, Procline-300) и определение длительности сохранения специфической активности при использовании ее в РМП. Изучены пять вариантов состава консервантов для Ag Кл, приготовленного из набора «Сифилис-Ag-Кл-РМП», активность каждой опытно-экспериментальной серии Ag Кл оценивали в динамике на 10 образцах контрольных сывороток при повторном исследовании через каждые 7–10 дней в течение 1,5 года их хранения. Анализ результатов проведенных исследований позволил выбрать наиболее эффективную рецептуру консервирующей добавки для длительного сохранения рабочей эмульсии Ag Кл, а также в длительном эксперименте определить сроки годности готового реагента. Одновременно отработаны технология и параметры процесса производственного выпуска готового к применению Ag Кл для РМП.

Заключение. Итогом работы явилось разработка модифицированного набора реагентов «Сифилис-AgКл-РМП» (по ТУ 9398–016–704237729–2010) в комплектации № 2, включающей в состав готовый к использованию стабилизированный Ag Кл, расфасованный по 5,0 мл в завинчивающиеся флаконы из темного стекла, и контрольные сыворотки (K+ и K–), что нашло отражение в дополнении к РУ № ФСР 2011 / 09957 от 30.10.2012. Результаты выполненных испытаний позволили опытным путем обосновать срок годности новой комплектации набора реагентов, который составил 1,5 года. Использование модифицированного Ag Кл направлено на стандартизацию условий выполнения РМП в разных лабораториях и экономию трудовых затрат специалистами лабораторной медицины.

Лабораторная диагностика персистирующей инфекции в крови *ex tempore*.

Н. И. Цирельников

Компания «МедБиоПродакшн», Прага, Чешская Республика; ФГБНУ «НИИ биохимии» СО РАН, г. Новосибирск

Laboratory diagnosis of persistent infection in blood ex tempore

N. I. Tsirelnikov

MedBioProduction sro., Prague, Czech Republic; the Research Institute of Biochemistry, Novosibirsk, Russia

В настоящее время появляются все большее количество работ, свидетельствующих о наличии бактериальной и грибковой инфекции в крови не только при лечении цитостатиками, облучении или химиотерапии, и целом ряде хронических соматических заболеваниях или экстренных состояний, но и в стадиях ремиссии и клинически неманифестируемых случаях.

Задачей настоящей работы было апробирование различных методов прижизненной микроскопии с целью выявления персистирующей инфекции в крови человека *ex tempore*.

Материал и методы. Материалом для исследования служила капиллярная кровь, забранная в стерильных условиях от 300 пациентов, в том числе были 17 доноров. Прижиз-

ненное изучение элементов крови проводили с помощью современных (световой, фазово-контрастный, темнопольный, поляризационный и люминисцентный) исследовательских микроскопов как нативных препаратов, так и окрашенных с помощью витальных красителей (нейтральный красный, метиленовый синий, флюоресцентных красителей — ФИТЦ, акридиновый оранжевый и др.). Главной особенностью современного метода прижизненной микроскопии является применение специализированных видеокамер, позволяющих визуализировать биологические объекты не только в видимой части спектра, но и, что особенно важно, в ближней инфракрасной (или ультрафиолетовой) области. Нами использована дигитальная камера Celestron и Color Video Camera Night Sensitivity SBLS (CNB). Премияемая нами технология приготовления препаратов позволяет *ex tempore* изучать клеточные и неклеточные формы нативной крови от 60 минут до 4–5 часов в зависимости от качества и количества инфекта.

Результаты. В связи с проведенными исследованиями показано существенное отличие структуры организации и морфологии клеточных и неклеточных элементов нативной крови по сравнению с общепринятыми методами изучения на высушенных, фиксированных и замороженных препаратах. Вполне естественно, что кровь, выполняющая огромный перечень жизненно важных функций, не может не отражать процессы, протекающие в организме в целом. Особенно большой интерес вызывает наличие в крови исследуемых пациентов, не имеющих каких-либо клинических проявлений, подвижных и неподвижных форм различных инфекционных агентов: бактерий, грибов, простейших, яиц и личинок паразитов. Как правило, при обычном бактериальном анализе крови этих пациентов с высоким содержанием бактерий (полибактеримией), результаты были либо отрицательными, либо характеризовались выявлением от одного до трех видов инфекта. Нередко отмечается отсутствие какой-либо морфологической реакции клеток белой крови на присутствие инфекта. В 15–27 процентах бактериемий была выявлена активация клеток белой крови с выраженной макрофагальной реакцией (передвижением по стеклу и фагоцитированием бактерий). Обращает на себя внимание факт зависимости морфологических форм эритроцитов, тромбоцитов и гранулоцитов с выраженностью и характером патологического процесса. При этом по мере исследования препарата резко возрастает число нарушенных, атипических и патологических форм. Это имеет большое клиническое значение при планировании проведения экстренных и плановых оперативных вмешательств, переливания крови, трансплантации и экстракорпорального оплодотворения, а также выбора тактики и стратегии химио- и радиотерапии. В то время как «нормальная» кровь не претерпевает особых изменений в течение длительного времени.

Выводы. В заключении необходимо отметить, что кровь человека в 85–93 процентах случаев является местом персистенции бактерий, реже грибов и простейших, иногда яиц гельминтов и их личинок, независимо от пола, возраста и клинического диагноза. Обнаружена тесная корреляция выявляемой инфекции с некоторыми аутоиммунными, дистрофическими и пролиферативными процессами в различных органах и тканях человека. Следует отметить, что метод прижизненной микроскопии на-

тивной крови является в достаточной мере объективным, достоверным и быстрым методом выявления персистирующей инфекции *ex tempore*. Кроме того, метод позволяет также регистрировать реакцию клеточных и неклеточных форм крови на физиологические и патологические процессы, происходящие в организме человека.

VI. Клиническая микробиология и антибиотикорезистентность

Технология ускоренного культурального определения лекарственной чувствительности клинических изолятов микобактерий туберкулеза на основе применения микобактериофагов с количественным анализом фаговой ДНК

М. А. Владимирский, Н. С. Смирнова, М. Б. Лапенкова, А. К. Шипина

НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России, г. Москва

Fast culture technique drug susceptibility detection of M.tuberculosis clinical isolates by using mycobacteriophages with quantitative DNA evaluation

M. A. Vladimirovsky, N. S. Smirnova, M. B. Lapenkova and A. K. Shipina
Phthiisopulmonology Research Institute of the First Moscow State Medical University n.a. I. M. Sechenov, Moscow, Russia

Обоснование. Ускоренное фенотипическое (культуральное) определение лекарственной чувствительности клинических изолятов микобактерий туберкулеза (МБТ) является одним из ключевых способов существенного повышения эффективности лечения туберкулеза и преодоления распространения лекарственно-устойчивых штаммов МБТ. Использование импортных жидких сред с автоматизированной детекцией результатов (Bactec MGIT) чрезвычайно дорого, а применение молекулярно-генетических методов и тест-систем с анализом ДНК-мутаций, ответственных за возникновение лекарственной устойчивости, ограничено в основном использованием анализа чувствительности к противотуберкулезным препаратам первой линии, поскольку для, например, группы аминогликозидов чувствительность этих методов недостаточна. Применение микобактериофагов для детекции роста микобактерий в жидкой питательной среде для ускоренного определения их лекарственной чувствительности активно, по данным международной литературы, изучалось в 2000-е годы и особенно в последние 3–4 года, в том числе с использованием количественного анализа фаговой ДНК. Нами этот метод рассматривается в качестве реальной перспективы разработки экономичного набора реагентов.

Цель. Разработка экономичного отечественного набора реагентов для ускоренного одновременного определения чувствительности МБТ к широкому спектру противотуберкулезных препаратов и изучение возможностей использования этой технологии для ускоренного персонализированного выбора комбинации препаратов.

Материалы и методы. Для определения чувствительности клинических изолятов МБТ использовали аликвоты (200 мкл) культур после первичного роста в системе Bactec, которые культивировали в 1 мл (общий объем) жидкой среды Миддлбрук 7H9 с 10% биодобавки OADC enrichment (Becton Dickinson) в 24-луночной планшете для культуры клеток в CO₂-инкубаторе при 37 °C 48 часов или в пробирках объемом 4,5–5,0 мл с закрытой крышкой. К тестируемым культурам вносили по 10 мкл лекарственного препарата для получения известной критической концентрации этого препарата в отношении МБТ для жидких питательных сред. В контрольную пробу препараты не добавляются. Затем во все образцы, включая контрольную пробу, вносили по 50 мкл микобактериофага D29 с биологической активностью 10⁶ плакообразующих единиц в мл и инкубировали последующие 24 часа. Препараты микобактериофага готовили, и тестировали активность предварительно. Затем проводилась очень простая процедура выделения ДНК фага. Образцы переносили в микропробирки типа «Эппендорф» и центрифугировали на микроцентрифуге при не менее 8 000 g пять минут; к осадку добавляли по 200 мкл деионизированной воды, прогревали при 95 °C 30 минут, после чего использовали по 5 мкл ДНК-содержащего материала для анализа в количественной ПЦР в реальном времени. Для ПЦР-анализа в нашей работе использовали отечественный прибор АНК-32. Результаты исследования анализировали по уровню пороговых циклов, отображаемых на экране монитора анализатора (C_t). Прирост порогового цикла (ΔC_t) более чем на два цикла в опытной пробе, содержащей антибиотик, по сравнению с контролем без антибиотика свидетельствовал о чувствительности тестируемой культуры. При отсутствии соответствующего уровня ΔC_t культуру считали устойчивой к исследуемому препарату. Все исследуемые культуры также были изучены с помощью традиционного метода определения лекарственной чувствительности: метод Левенштейна-Иенсена с культивированием микобактерий на плотной питательной среде. Лекарственная чувствительность 62 клинических штаммов была изучена двумя методами в отношении четырех противотуберкулезных препаратов (стрептомицин, изониазид, рифампицин и этамбутол) и 49 штаммов в отношении других четырех препаратов резервного ряда (амикацин, капреомицин, канамицин и этамбутол). Кроме того, пять образцов мокроты, полученных от больных активной формой туберкулеза легких, культивировались в жидкой питательной среде с использованием набора реагентов MGIT Bactec (Becton Dickinson) с последующим, после детекции положительного результата роста МБТ, сравнительным определением лекарственной чувствительности одновременно к 10 специфическим препаратам с помощью технологии MGIT Bactec и с помощью исследуемого метода с использованием микобактериофагов.

Результаты. Совпадаемость результатов определения лекарственной чувствительности с помощью традиционного метода Левенштейна-Иенсена и метода с использованием микобактериофагов в отношении первых четырех препаратов составила в среднем 91 %. В этой группе из 62 штаммов 66 % культур в среднем были устойчивыми

к тестируемым препаратам. В отношении второй группы из 49 штаммов с исследованием чувствительности к четырем лекарственным препаратам так называемого резервного ряда совпадаемость результатов составила 87 % при уровне устойчивости в среднем 20 %. При сравнении результатов исследования чувствительности пяти культур МБТ к 10 лекарственным препаратам при использовании технологии MGIT Bactec и исследуемого фагового метода различия наблюдались только в отношении одного препарата моксифлоксацина в двух культурах, то есть совпадаемость результатов составила 96 %. При количественном анализе ДНК микобактериофага при исследовании клинических культур МБТ превышение пороговых уровней C_t при чувствительности культуры к исследуемому препарату по сравнению с контролем, то есть ΔC_t колебалось от 2,5 до 13. Имеющиеся у нас данные подтверждают тезис о том, что величина ΔC_t коррелирует с эффективностью ингибирования роста микобактерий.

Выводы. Полученные результаты подтверждают недавно опубликованные в международной литературе данные об эффективности технологии ускоренного (четыре дня по сравнению с 8–10 днями по технологии MGIT Bactec) фенотипического (культурального) определения лекарственной чувствительности МБТ с использованием микобактериофага D29. Расчеты себестоимости реагентов и компонентов прототипа такой тест-системы показывают возможность создания весьма экономичного отечественного набора реагентов для быстрого одновременного определения лекарственной чувствительности клинических изолятов МБТ к широкому спектру противотуберкулезных препаратов. Указанная технология открывает также возможности персонализированного выбора препаратов на основе анализа лекарственной чувствительности популяции МБТ, выделяемых больными туберкулезом.

Инфекции, вызванные мульти- и пан-резистентными микроорганизмами в онкологической клинике

Н. В. Дмитриева, З. В. Григорьевская, Н. С. Багирова, И. Н. Петухова, И. В. Терещенко, И. И. Шильникова, Е. В. Кулага, Т. А. Калинин

ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва

Infections caused by multi- and pan-resistant microorganisms in cancer hospital

N. V. Dmitrieva, Z. V. Grigoryevskaya, N. S. Bagirova, I. N. Petukhova, I. V. Tereshchenko, I. I. Shil'nikova, E. V. Kulaga, T. A. Kalinchuk
The Russian Oncological Scientific Centre n.a. N. N. Blokhin, Moscow, Russia

Цель. Анализ частоты нозокомиальных инфекций, вызванных пан- и мультирезистентными микроорганизмами среди онкологических больных.

Материалы и методы. Идентификация микроорганизмов и определение чувствительности к антибиотикам проводилась и использованием автоматических микробиологических систем MS Maldi-TOF, Vitek-2, MicroScan WalkAway. В течение последних лет были проанализированы 8326 микроорганизмов (без повторных выделений), из которых 60 % были представлены грамотрицательными и 40 % грамположительными микроорганизмами. Чув-

ствительность микроорганизмов (определение минимальных ингибирующих концентраций [МИК] с последующей интерпретацией как чувствительные или резистентные к антибиотикам) определялась также автоматическими микробиологическими системами. Статистическая обработка проводилась с использованием программ вышеуказанных анализаторов. Инфекционные осложнения были представлены инфекциями мочевых путей (МИ) в 38 % случаев, инфекциями дыхательных путей (ИД) — 32 %, раневыми инфекциями (поверхностными, глубокими и органнопространственными) (РИ) — 23 %, инфекциями кровотока (ИК) — 4 %, прочие — 3 %.

Результаты. Наиболее частыми возбудителями инфекций среди грамотрицательных микроорганизмов были: *Acinetobacter baumannii* (19,6 %); синегнойная палочка, *Pseudomonas aeruginosa* (20,9 %); *Klebsiella pneumoniae* (15,4 %); кишечная палочка, *Escherichia coli* (19,2 %). *A. baumannii* среди прочих грамотрицательных микроорганизмов была выявлена при ИД в 34,3 % случаев, РИ — 29,4 %, МИ — 12,7 %, ИК — 4,9 %. *P. aeruginosa* составила при ИД 30,8 %, РИ — 28,7 %, МИ — 17,3 %, ИК — 5,2 %. *K. pneumoniae* составила при ИД 31,7 %, РИ — 18,6 %, МИ — 21,7 %, ИК — 5,8 %. *E. coli* составила при ИД 9,9 %, РИ — 24,8 %, МИ — 48,3 %, ИК — 4,2 %. Количество карбапенем-резистентных штаммов было максимальным при инфекциях, вызванных *A. baumannii* и составило в отношении имипенема и меропенема 100 и 86 % соответственно, среди *P. aeruginosa* — 29 и 59 %, среди *K. pneumoniae* 29 и 85 % соответственно. Среди *E. coli* карбапенем-резистентные штаммы не встречались, хотя количество штаммов-продуцентов бета-лактамаз расширенного (БЛРС) спектра составило 44 %, что значительно ниже, чем у *K. pneumoniae* (98 %). Золотистый стафилококк, *Staphylococcus aureus* выделялся в 13 % случаев из всех патологических материалов. При этом метициллин-резистентные варианты (MRSA) встречались в 5 %. Частота встречаемости энтерококков составила 12 и 9 % для *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* соответственно. Количество ампициллин-резистентных энтерококков составляло 2 и 98 % случаев, а ванкомицин-резистентных (VRE) — 2 и 10 % случаев соответственно.

Выводы. Наиболее часто среди грамотрицательных возбудителей, вызывающих нозокомиальные инфекции в онкологической клинике, выявляются *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*. Высокая частота выявления карбапенем-резистентных штаммов (29–100 %) диктует необходимость ограничения использования этих антибиотиков в клинике. При выявлении БЛРС-продуцентов (44–98 %) вместо карбапенемов возможно использование «защищенных» пенициллинов и цефалоспоринов (пиперациллин / тазобактам, цефоперазон / сульбактам). Однако результаты антибиотикограммы и МИК являются определяющими при выборе режима антибиотикотерапии. Наиболее часто среди грамположительных возбудителей инфекций встречались *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*. Низкая частота встречаемости MRSA (12 %) не позволяет использовать ванкомицин для эмпирической терапии стафилококковых инфекций;

препаратами выбора являются полусинтетические пенициллины. В то же время при инфекциях, вызванных *E. faecalis*, препаратом выбора является ампициллин или ампициллин / сульбактам в связи с высокой чувствительностью данного микроорганизма к аминопенициллинам. При инфекциях, вызванных *E. faecium*, препаратом выбора является ванкомицин. Низкая частота встречаемости VRE позволяет использовать ампициллин (ампициллин / сульбактам) или ванкомицин соответственно в зависимости от вида энтерококка для эмпирической терапии инфекций, вызванных этими возбудителями.

Альтернативная оценка постгеномного риска патогенности групп клинических штаммов стафилококков, различающихся резистентностью к антибиотикам и способностью к образованию биопленок

В. М. Лахтин, А. Л. Байракова, М. В. Лахтин, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, г. Москва

Alternative evaluation of postgenomic risk of pathogenicity of groups of clinical strains of staphylococci which are different in resistance to antibiotics and capacity to form biofilms

V. M. Lakhtin, A. L. Bayrakova, M. V. Lakhtin, S. S. Afanasyev, V. A. Aleshkin

The Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology n.a. G. N. Gabrichevsky, Moscow, Russia

Установление риска патогенности / степени вирулентности клинически значимых микроорганизмов является важным в повседневной работе клиницистов. Цель — провести мультифакторную оценку риска патогенности (РП) клинических штаммов-изолятов стафилококков; предложить новые критерии оценки РП групп и подгрупп условно-патогенных микроорганизмов на примере стафилококков городской ПП с помощью сравнения рядов ранжирования антибиотикочувствительности.

Материалы и методы. Исследовали 43 клинических штамма стафилококков *S. epidermidis* городской популяции пациентов (ПП), наблюдавшихся в КДЦ при МНИИЭМ имени Г. Н. Габричевского. Антибиотикорезистентность стафилококков определяли диск-диффузионным методом на агаре с использованием стандартных диск-антибиотиков (1 — цефазолина, 2 — цефотаксима, 3 — доксициклина, 4 — спирамицина, 5 — кларомеропроцина, 6 — ампицилина, 7 — азитромицина, 8 — рокситромицина). Гемолиз стафилококками регистрировали на агаре с кровью. Способность бактерий в культурах к биопленкообразованию (БПО) оценивали в полистироловой плоскостной микропанели окрашиванием пленки генцианвиолетом, экстракцией красителя и фотометрией экстракта в видимой области.

Результаты. Предложен экспериментальный подход к оценке РП групп клинических штаммов стафилококков городской ПП. Алгоритм подхода заключался в следующем.

1. Пул стафилококков *Staphylococcus epidermidis* ПП делили на группы и подгруппы (5–6 штаммов) по выраженности полной и частичной антибиотикорези-

стентности (ПАР и ЧАР соответственно) к одному или более дисковым антибиотикам, что соответствовало ожидаемому модельному возрастианию РП в ряду групп I, II, IV, V (таблица антибиотико-чувствительности / резистентности).

2. По данным таблицы строили ряды ранжирования антибиотикочувствительности в ПП, группах; подгруппах Ia, Ib, Iv, Ig, II, IIb.

2.1. Сравнивали ранжированные ряды ПП с ее группами и подгруппами (дана оценка статистической достоверности различий).

2.1.1. ПП, группа I (ПАР к одному антибиотику) и ее подгруппы (с учетом дополнительной ЧАР) характеризовались снижением антибиотикочувствительности в рядах:

- ПП: 1 > 3 > 4 > 5, 6 > 7 > 8;
- Ia: 1 > 2 > 3, 7, 8 > 5 > 4 > 6*, *-ЧАР;
- Ib: 2, 1 > 3 > 8, 5 > 4, 7 > 6*;
- Iv: 6 > 1 > 2 > 3, 4 > 5 > 7 > 8**, **-ПАР;
- Ig: 5 > 2 > 1, 3 > 4 > 6 > 8 > 7**. При сравнении I и ПП по мере возрастания РП в подгруппах (в направлении от появления ЧАР и затем ПАР) наблюдался блочный характер изменений антибиотикочувствительности (регистировалось смещение блока [1, 2 и 3] в направлении появления ЧАР и ПАР). По этому критерию РП в подгруппах I возрастало в ряду: (Ia, Ib), (Iv, Ig).

2.1.2. В группе II регистрировались следующие ряды. IIa: 1 > 4 > 2 > 7 > 3 > 5 > 6* > 8**, IIb: 2 > 1 > 6 > 3 > 7* > 4* > 5**, 8**. В II была нарушена сблоченность сочетания 1, 2 и 3 (при сравнении с ПП и I), что указывало на дальнейшее возрастание РП в II (II > I). Нарушение сблоченности являлось еще одним критерием, указывающим на относительно повышенный РП группы / подгруппы.

2.1.3. В группах IV и V наблюдались наиболее сильные нарушения последовательности ПП за счет максимального вклада ПАР (максимально выраженной мультирезистентности к антибиотикам). IV: 2 > 1 > 4 > 3 > 5**, 6**, 7**, 8**. V: 2 > 1 > 4 > 3**, 5**, 6**, 7**, 8**.

3. Исследовали способность других факторов влиять на выраженность РП в группах. Возрастание БПО в ряду $V < IIa \leq IIb < Iv < Ig$ соответствовало ранжированию групп по ожидаемой выраженности РП, согласно мультиантибиотикорезистентности. Наблюдавшийся гемолиз в IV осложнял сравнительную оценку БПО.

Выводы. 1) Предложен экспериментальный подход к ранжированной оценке риска патогенности различающихся по антибиотикорезистентности групп популяции клинических штаммов микроорганизмов региона на примере стафилококков. 2) Предложенный на основании экспериментального подхода алгоритм группового ранжирования условно-патогенных микроорганизмов по антибиотикочувствительности использует новые критерии блочной индикации РП в условиях отсутствия классификации групп по мультирезистентности к антибиотикам. 3) Учет дополнительных потенциальных факторов вирулентности в группах позволит проводить

дальнейшую прогностико-диагностическую оценку постгенотипного РП групп клинически значимых изолятов микроорганизмов расширенной популяции локального контингента индивидуумов. 4) В последнем случае результаты имеют эпидемиологическое значение.

Мультиплексный генетический анализ детерминант антибиотикорезистентности возбудителей инфекций, приводящих к нарушению репродуктивных функций

А. Т. Лейнсоо, Е. А. Дементьева, Б. Л. Шаскольский, А. В. Честков, В. С. Соломка, Д. Г. Дерябин, А. А. Кубанов, Д. А. Грядунов

ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта» РАН, ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России; г. Москва

Multiplex genetic testing of drug resistance determinants in microorganisms causing infections of human reproductive system

A. T. Leinsoo, E. I. Dementyeva, B. L. Shaskol'skiy, A. V. Chestkov, V. S. Solomka, D. G. Deryabin, A. A. Kubanov, D. A. Gryadunov
The Institute of Molecular Biology n.a. V. A. Engelhardt, the State Scientific Centre for Dermovenereology and Cosmetology; Moscow, Russia

Патологические состояния органов репродуктивной системы человека часто носят полимикробный характер, представленный как облигатными патогенами (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma genitalium*), так и различными условно-патогенными микроорганизмами. Полимикробный характер изменяет клиническую картину заболевания, отягощает течение воспалительного процесса, снижает эффективность выявления этиологического агента, вызвавшего заболевание, что может привести к назначению неадекватной терапии. Серьезной проблемой во всем мире является рост лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний, что вызывает значительные затруднения при выборе методов лечения пациентов. Опубликованный в 2014 году ВОЗ глобальный доклад по эпиднадзору «Устойчивость к противомикробным препаратам» наряду с доминированием лекарственно-устойчивых форм туберкулеза, малярии и стафилококков выделяет мультирезистентные *N. gonorrhoeae*, включая появление штаммов с пониженной чувствительностью к цефалоспорином третьего поколения, и *Escherichia coli* (устойчивость к фторхинолонам и цефалоспорином). Таким образом, для выяснения этиологии инфекционно-воспалительного процесса органов мочеполовой системы и последующей успешной терапии необходимо не только выявление в клинических образцах микроорганизмов, включая одновременную идентификацию большого количества возбудителей, но также анализ чувствительности / устойчивости инфекционных агентов к основным антимикробным препаратам.

Цель. Разработка экспресс-метода идентификации возбудителей инфекций, приводящих к нарушению репродуктивных функций (ИПНРФ) с одновременным установлением генетических маркеров их резистентности к спектру широко используемых антимикробных препаратов.

Материалы и методы. Для идентификации возбудителей ИПНРФ с одновременным анализом генетических детерминант резистентности, разработан молекулярный ме-

тод на основе технологии гидрогелевых микрочипов ИМБ РАН. Микрочип содержит иммобилизованные олигонуклеотиды, соответствующие видоспецифичному полиморфизму гена 16S рРНК для идентификации микроорганизмов, а также зонды, специфичные к последовательностям генов *rrs*, *rrl*, *gyrA*, *parC*, *mefA*, *mtrR*, *nimB-G*, *penA*, *ponA*, *porB*, *rpsJ*, *ntr4tv*, *ntr6tv*, *blaSHV*, *blaTEM*, *tetM*, *tetO*, являющихся детерминантами резистентности возбудителей ИПНРФ к бета-лактамам антибиотикам, включая цефалоспорины, макролидам, аминогликозидам, тетрациклином, спектиномицину, фторхинолонам и нитроимидазолам. Процедура анализа включает мультиплексную ПЦР с одновременным флуоресцентным маркированием исследуемых сегментов геномов с последующей гибридизацией на микрочипе. С использованием разработанного подхода исследованы 374 образца ДНК из культур возбудителей ИПНРФ и клинического материала, охарактеризованных культуральными методами, ПЦР с детекцией в режиме реального времени, таргетным секвенированием.

Результаты. Разработанный метод позволяет выявлять 17 различных облигатных и условно-патогенных микроорганизмов *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. pallidum*, *M. genitalium*, *Atopobium vaginae*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus mulieris*, *Mycoplasma hominis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus anginosus*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum* с одновременным дифференцированным анализом 49 генетических детерминант устойчивости к семи классам антимикробных препаратов. Диагностические чувствительность и специфичность метода, рассчитанные по результатам анализа 374 образцов, превышают 95 % при определении возбудителей ИПНРФ и находятся в диапазоне 80–92 % при анализе резистентности к различным антибиотикам. Отличительной особенностью разработанного метода является идентификация генетических детерминант, ассоциированных с одновременной резистентностью микроорганизма к различным классам антимикробных препаратов (множественная лекарственная устойчивость). В частности, микрочип выявляет мутации в гене *porB*, продукт которого осуществляет транспорт антибиотиков через наружную мембрану (белки-порины *PorB*), а также специфические мутации в промоторе и кодирующей части гена *mtrR*, являющегося репрессором транскрипции *mtrCDE* оперона, ответственного за регуляцию экспрессии помпы эффлюкса *MtrC — MtrD — MtrE*, выводящей антибиотика из периплазматического пространства клетки. С использованием созданных гидрогелевых микрочипов исследованы 128 изолятов *N. gonorrhoeae*, полученных в 2015 году в девяти субъектах РФ. У трети анализируемых штаммов обнаружены множественные детерминанты резистентности, в результате чего мутационные профили и паттерны устойчивости к антибактериальным препаратам приобрели отличное от нормального бимодальное статистическое распределение. Показана роль мутаций в генах *penA* и *ponA*, ассоциированных с устойчивостью к пенициллином, в современной эволюции *N. gonorrhoeae*, заключающейся в прогрессирующем снижении чувствительности к цефалоспорином III поколения.

Выводы. Разработанный метод является перспективным инструментом мониторинга антибиотикорезистентности возбудителей ИПНРФ, позволяя устанавливать вид микроорганизма и анализировать генетические маркеры устойчивости к различным классам антимикробных препаратов.

Работа выполнена при поддержке субсидии 14.607.21.0065 (RFMEFI60714X0065) Министерства образования и науки РФ.

Кровь баранья дефибринированная для приготовления питательных сред

С. Г. Марданлы, Н. В. Бахилина, С. В. Ротанов, М. А. Котляр
ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская область

Defibrinated lamb blood for preparation of nutrient medium

S. G. Mardany, N. V. Bakhilina, S. V. Rotanov, M. A. Kotlyar
ECOLab Co., Elektrogorsk, Moscow Region, Russia

Для приготовления обогащенных питательных сред, предназначенных для культивирования и оценки свойств бактериальной флоры, в клинической микробиологии используют дефибринированную кровь животных (барана, крупного рогатого скота, лошадей, кроликов). Наиболее часто в лабораториях использовалась кровь барана, однако ее приходилось использовать свежеприготовленной, так как не существовало стандартного коммерческого препарата.

Цель. Разработать условия получения и выпуска дефибринированной крови барана в качестве медицинского изделия для использования в лабораториях медицинских организаций России.

Результаты. В результате проведенных исследований были разработаны щадящие физиологические условия, обеспечивающие возможность регулярного получения у баранов, содержащихся на производственном предприятии, цельной венозной крови, и изучен процесс естественного воспроизводства объема циркулирующей крови у животных-доноров крови. Отработана технология удаления из полученной крови фибрина путем его осаждения на поверхности стерильных стеклянных гранул без повреждения форменных элементов (эритроцитов), состав стабилизирующих добавок для обеспечения длительного хранения полученной дефибринированной крови. Испытания свойств 5-процентного кровяного агара, приготовленного на основе питательного агара с добавлением дефибринированной крови барана, приготовленной в ЗАО «ЭКОлаб» позволило установить его высокие ростовые свойства при культивировании микроорганизмов, требующих присутствия крови животных (*St. aureus*, *Str. pneumoniae*, *Str. pyogenes*, *Ent. faecalis*, *S. agalactiae*, *Cl. perfringens*, *L. monocytogenes*). При этом обеспечиваются условия для визуальной оценки гемолитической активности культивируемых микроорганизмов (альфа- или бета-гемолиз) или отсутствия указанных свойств (гамма-гемолиз). В качестве варианта производственного выпуска медицинского изделия организован выпуск дефибринированной крови барана с добавлением цитрата натрия.

Заключение. Медицинское изделие «Кровь баранья дефибринированная для питательных сред стерильная» по ТУ 9389–073–70423725–2007 разрешена к применению в медицинских организациях Российской Федерации

(ПУ № ФСР 2008/03081 от 30 июля 2008 года). Изделие выпускается ЗАО «ЭКОлаб» (Московская обл., г. Электрогорск) и предназначено для обогащения плотных микробиологических питательных сред и определения гемолитической активности культивируемых микроорганизмов. Кровь баранья дефибринированная для питательных сред стерильная (комплектации № 1) имеет срок годности 14 суток, а при добавлении цитрата натрия (комплектация № 2) срок годности увеличивается до 30 суток.

Мониторинг микробиоценоза миндалин студентов, больных хроническим тонзиллитом

Е. А. Михайлова¹, А. Ю. Миронов², С. Б. Киргизова¹,
О. О. Жеребятёва¹, Т. О. Федорова¹, Д. Р. Сафарова¹,
А. М. Азнабаева¹, М. В. Фомина¹

¹ГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Оренбург; ²ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, г. Москва

Monitoring of microbiocenosis tonsils in students with chronic tonsillitis

E. A. Mikhailova¹, A. Yu. Mironov², S. B. Kirgizova¹, O. O. Zherebyateva¹,
T. O. Fyodorova¹, D. R. Safarova¹, L. M. Aznabaeva¹, M. V. Fomina¹

¹Orenburg State Medical University, Orenburg; ²the Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology n.a. G. N. Gabrichevsky, Moscow; Russia

G. N. Gabrichevskii Moskovskii research institute of epidemiology and microbiology of Rosпотребнадзор, Moscow, Russia

Хронический тонзиллит занимает одно из ведущих мест в структуре ЛОР-патологии. В настоящее время отмечается увеличение удельного веса ассоциированной бактериально-бактериальной и бактериально-грибковой этиологии хронического тонзиллита. В связи с этим определенный интерес представляет изучение видового состава микроорганизмов слизистой оболочки миндалин лиц, больных хроническим тонзиллитом.

Цель: изучение микробиоценоза слизистой оболочки небных миндалин у студентов-медиков, больных хроническим тонзиллитом.

Материалы и методы. Согласно классификации хронических тонзиллитов по Б. С. Преображенскому, В. Т. Пальчуну, А. И. Крюкову (2002) в исследование вошли 80 студентов с простой формой хронического тонзиллита вне обострения, обучающихся на различных факультетах Оренбургского государственного медицинского университета в возрасте $24 \pm 3,8$ года. Юношей было 36 (45 %), девушек — 44 (55 %). Длительность течения хронических тонзиллитов до пяти лет встречалась у 53 (66,2 %) пациентов, более пяти у 16 (20 %), более 10 лет у 11 (13,8 %) пациентов. Бактериологическое обследование включало выделение микрофлоры слизистой оболочки миндалин и идентификацию микроорганизмов с помощью стандартных тест-систем (LaChema, Чехия).

Результаты. В микробиоценозе обследуемых лиц доминировали представители грампозитивной флоры, такие как бактерии рода *Streptococcus* — *Streptococcus pneumoniae* ($38,4 \pm 7,6$ %), *Streptococcus pyogenes* ($17,9 \pm 6,1$ %), *Streptococcus salivarius* ($23,6 \pm 6,6$ %), *Streptococcus mitis/oralis* ($13,2 \pm 5,3$ %), *Streptococcus viridians* ($5,1 \pm 3,4$ %), *Streptococcus sanguinis* ($2,5 \pm 2,4$ %) и рода *Staphylococcus* —

Staphylococcus aureus ($12,8 \pm 5,2\%$), *Staphylococcus epidermidis* ($12,8 \pm 5,2\%$), *Staphylococcus haemolyticus* ($10,2 \pm 4,8\%$). В небольшом проценте случаев выделялись представители родов *Lactococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* ($5,1 \pm 3,4\%$ случаев). Анализ бактериальной обсемененности миндалин грамотрицательной флорой показал присутствие следующих родов: *Escherichia spp.*, *Escherichia coli* ($2,5 \pm 2,4\%$) и *Neisseria spp.* ($7,6 \pm 4,1\%$ случаев). Грибы рода *Candida spp.* выделялись в $28,2 \pm 7,1\%$ случаев. Этиологически значимые патогенные виды были выделены от больных как в монокультуре — *Streptococcus pneumoniae* ($38,4 \pm 7,6\%$), *Streptococcus pyogenes* ($17,9 \pm 6,1\%$), *Candida spp.* ($28,2 \pm 7,1\%$), *Staphylococcus aureus* ($12,8 \pm 5,2\%$ случаев), так и в бактериальных ассоциациях — *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* ($7,8 \pm 4,2\%$), *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* ($13,2 \pm 5,3\%$) и грибково-бактериальных ассоциациях с представителями рода *Candida* ($28,2 \pm 7,1\%$ случаев).

Выводы. Микрофлора миндалин у обследуемых лиц обладала большим видовым разнообразием, что несвойственно здоровым людям, а также характеризовалась присутствием патогенных видов микроорганизмов как в монокультуре, так и в ассоциациях, в том числе и с грибами рода *Candida*. Полученные данные могут быть использованы при решении вопросов о назначении эффективных лекарственных препаратов для терапии пациентов с хроническим тонзиллитом.

Состояние микробиоценоза и антибиотикорезистентность Enterobacteriaceae в тканях пародонта при пародонтите и периодонтите

В. П. Мудров¹, М. В. Стамм¹, М. С. Мяндиев², И. С. Фоменков², В. Н. Нелюбин³, Г. И. Макаренко⁴, Т. В. Черненко⁴, Д. А. Шмаров⁵

¹ФГБУ «9-й лечебно-диагностический центр» Минобороны России, г. Москва; ²ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, г. Москва; ³ФГАОВ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), г. Москва; ⁴ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА. Клиническая больница № 123, г. Одинцово, Московская область; ⁵ГБУЗ г. Москвы «Инфекционная клиническая больница № 1» Департамента здравоохранения г. Москвы

Microbiocenosis and antibiotic-resistant Enterobacteriaceae in periodontal tissues in parodontitis and periodontitis

V. P. Mudrov¹, M. V. Stamm¹, M. S. Myandiev², I. S. Fomenkov², V. N. Nelyubin³, G. I. Makarenko⁴, T. V. Chernenko⁴, D. A. Shmarov⁵

¹Therapeutic and Diagnostic Center № 9 of The Ministry of Defense of Russia, Moscow; ²The Moscow State Medical and Stomatological University n.a. A.I. Evdokimov, Moscow; ³The People's Friendship University of Russia, Moscow; ⁴Clinical Hospital № 123, Odintsovo; ⁵The Infectious Clinical Hospital № 1, Moscow, Russia

Цель. Определение вирусного, бактериального пейзажа и антибиотикорезистентности в тканях пародонта у пациентов после удаления зубов при пародонтите и периодонтите.

Материалы и методы. Исследованы образцы материала, полученного от 68 пациентов в возрасте от 19 до 82 лет. У 42 пациентов было обострение генерализованного пародонтита, у 26 — острый периодонтит. Средний возраст в группах составлял соответ-

ственно $64,1 \pm 1,7$ и $52,9 \pm 3,6$ года. Микробиологическое исследование проводили путем посева биоматериала на кровяной агар с последующим переносом колоний на матрицу и масс-спектрометрией. Для идентификации микроорганизмов использованы методы, основанные на время-пролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией-ионизацией из матрицы MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) на приборе Autoflex (Bruker, Германия). Антибиотикорезистентность Enterobacteriaceae, *S. aureus* и гены устойчивости к карбапенемам, цефалоспорином, оксациллину, пенициллинам, ванкомицину и тейкопланину, а также метициллин-резистентные коагулазонегативные *Staphylococcus spp.*, метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* выявляли методом ПЦР. Вирусы группы герпеса, в том числе вирус Эпштейна-Барр (ЭБВ) и цитомегаловирус (ЦМВ) определяли методом ПЦР с использованием наборов фирмы «Литех».

Результаты. При анализе были выявлены 18 типов микроорганизмов: *Candida albicans* (19,1%), *Candida dubliniensis* (1,5%), *Streptococcus viridans* (4,4%), *Str. mitis* (25%), *E. coli* (23,5%), *Staphylococcus epidermidis* (22,1%), *Str. pneumoniae* (1,5%), *Staph. capitis* (2,9%), *Str. vestibul* (4,4%), *Staph. aureus* (3%), *Ent. cloacae* (1,5%), *Acinetobacter lwoffii* (1,5%), *Strep. salivarius* (5,9%), *Staph. hominis* (1,5%), *Lactobacillus fermentum* (1,5%). В 25 случаях (из 63) были получены два типа колоний, в пяти случаях не было роста. Более двух типов микроорганизмов ни в одном случае не удалось выявить. Были выявлены гены антибиотикорезистентности Enterobacteriaceae к цефалоспорином и карбапенемам ctx-M (1,5%), vim (4,4%), oxa-48 (1,5%), mecA (16,2%). Причем ген резистентности mecA *S. aureus* выявлялся в культуре *Staphylococcus epidermidis* (7,4%). У 17 пациентов в 18 (28,5%) случаях были обнаружены группы герпеса, представленные главным образом вирусом Эпштейна-Барр (ЭБВ). Было получено, что вирус ЭБВ наиболее часто ассоциировался с *Candida albicans*. Частота этих ассоциаций у пациентов с обострением хронического генерализованного пародонтита была достоверно выше, чем у больных периодонтитом ($p < 0,028$ по критерию Фишера). Другие типы вирусов герпеса и цитомегаловирус не были выявлены.

Выводы. Полученные данные могут свидетельствовать о вероятном участии ЭБВ-вируса в ассоциации с *Candida albicans* в патогенезе генерализованного пародонтита. Дальнейшего пристального изучения заслуживает вопрос передачи генов антибиотикорезистентности у микроорганизмов Enterobacteriaceae и Staphylococcus spp.

Выявление антибиотикорезистентности микроорганизмов при бактериально-вирусном инфицировании слизистой оболочки желудочно-кишечного и урогенитального тракта

В. П. Мудров¹, И. С. Фоменков², М. С. Мяндиев², В. Н. Нелюбин³, М. В. Стамм¹, С. Г. Утенкова¹, О. А. Милов¹, Г. И. Макаренко⁴, Т. В. Черненко⁴, Д. А. Шмаров⁵

¹ФГБУ «9-й лечебно-диагностический центр» Минобороны России, г. Москва; ²ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Минздрава России, г. Москва; ³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), г. Москва; ⁴ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА. Клиническая больница № 123, г. Одинцово, Московская область; ⁵ГБУЗ г. Москвы «Инфекционная клиническая больница № 1» Департамента здравоохранения г. Москвы

Detection of antibiotic resistance of bacterial and viral infections of mucous of gastrointestinal and urogenital tract

V. P. Mudrov¹, I. S. Fomenkov², M. S. Myandiev², V. N. Nelyubin³, M. V. Stamm¹, S. G. Utenkova¹, O. A. Milov¹, G. I. Makarenko⁴, T. V. Chernenko⁴, D. A. Shmarov⁵

¹Therapeutic and Diagnostic Center № 9 of The Ministry of Defense of Russia, Moscow; ²The Moscow State Medical and Stomatological University n.a. A.I. Evdokimov, Moscow; ³The People's Friendship University of Russia, Moscow; ⁴Clinical Hospital № 123, Odintsovo; ⁵The Infectious Clinical Hospital № 1, Moscow; Russia

Цель. Оценить воздействие на слизистую оболочку бактериально-вирусной ассоциации микроорганизмов и определить их влияние на выработку антибиотикорезистентности.

Материалы и методы. Проведено обследование 103 амбулаторных пациентов с различными патологиями желудочно-кишечного (66) и урогенитального тракта (37). Из них 32 пациента в возрасте от 23 до 55 лет с диагнозом «агрессивная форма хронического генерализованного пародонтита». И 44 госпитализированных пациентов с гнойно-септическими осложнениями заболеваний желудочно-кишечного и урогенитального тракта. Одновременно с посевом на питательные среды методом ПЦР выявляли гены устойчивости к карбапенемам, цефалоспорином, оксациллину, пенициллинам, ванкомицину и тейкопланину.

Результаты. В посевах при гнойно-септических осложнениях у госпитализированных пациентов были выделены культуры *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *St. aureus*, *St. epidermidis*, *St. saprophyticus*. Наибольшая резистентность обнаружилась к цефалоспорином и пенициллинам. Гены антибиотикорезистентности *ctx-M*, *mecA*, *vim*, *оха-48* были выявлены в культурах *St. aureus*, *St. epidermidis*, *E. coli*. У больных пациентов чаще всего выявлялись гены антибиотикорезистентности к цефалоспорином — в 58,4% случаев. У амбулаторных пациентов с агрессивной формой пародонтита были выявлены патогенные виды бактерий *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*. При этом не было выявлено генов резистентности к карбапенемам, цефалоспорином, ванкомицину и тейкопланину. В 34% был обнаружен ген *mecA* *Staphylococcus aureus*, характеризующий устойчивость к β-лактаму антибиотик оксациллину. Была обнаружена корреляция при инфицировании желудочно-кишечного тракта вирусом Эпштейна-Барр и *Candida albicans*.

Выводы. При гнойно-септических осложнениях у госпитальных больных формируется полирезистентность к антибиотикам. Бактериально-вирусное инфицирование и формирование биопленки на слизистой оболочке желудочно-кишечного и урогенитального тракта способствует развитию такой антибиотикорезистентности.

Антимикробная терапия грамположительных инфекций

И. Н. Петухова, Н. В. Дмитриева, Н. С. Багирова, З. В. Григорьевская, И. И. Шильникова, И. В. Терещенко

Лаборатория микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии, ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва

Antimicrobial therapy of grampositive infections

I. N. Petukhova, N. V. Dmitrieva, N. S. Bagirova, Z. V. Grigoryevskaya, I. I. Shilnikova, I. V. Tereshchenko

The Russian Oncological Scientific Centre n.a. N. N. Blokhin, Moscow, Russia

Цель исследования. Оценить распространенность грамположительных инфекций у онкологических больных в период пребывания в специализированном стационаре и показать эффективность современных антиграм(+) антибиотиков

Материалы и методы. Проанализированы 998 грамположительных микроорганизмов (стафилококки — 551 штамм, энтерококки — 412 штаммов и стрептококки — 35 штаммов), выделенных из различных патологических материалов от больных, находившихся в стационаре с января 2014-го по июнь 2015 года, распространение среди них резистентных микроорганизмов, и оценена возможность использования современных антиграм(+) антибиотиков.

Результаты. Стафилококки были представлены в основном коагулазо-негативными стафилококками (КНС) — 405 штаммов (73,5% от числа всех выделенных стафилококков), *Staphylococcus aureus* — 146 штаммов (26,5%). Количество метициллин-резистентных *S. aureus* (MRSA) составляло 11,6%, MR-КНС — 76%. В отношении этих штаммов были активны ванкомицин (за исключением четырех штаммов *S. aureus* [2,7%] и двух штаммов MR-КНС [0,5%]). Резистентных к линезолиду и даптомицину штаммов в указанный период времени выявлено не было. Энтерококки, представленные в 97,8% случаев двумя видами, — *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* (61,8 и 36,0% соответственно). 23 из 412 штаммов энтерококков были резистентны к ванкомицину (5,5%), а 17 из них были также резистентны к линезолиду (17 из 412, 4,1%). Стрептококки в 100% были чувствительны к ванкомицину и линезолиду.

Выводы. Общее количество резистентных золотистых стафилококков и энтерококков было невелико, и используемые в настоящее время для их лечения антибиотики ванкомицин и линезолид, а для стафилококков также даптомицин могут применяться с целью лечения больных с госпитальными инфекциями, вызванными этими микроорганизмами. Госпитальных инфекций, вызываемых стрептококками крайне мало, и все они чувствительны к терапии. Обращает на себя внимание появление линезолид-резистентных энтерококков, что может говорить о чрезмерно широком использовании данного препарата в клинике и может привести к росту инфекций, вызываемых подобными микроорганизмами, лечение которых будет представлять существенные трудности в лечении.

Антагонистические особенности штаммов синегнойной палочки, выделенных при гнойно-воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта

Т. О. Федорова, Е. А. Михайлова, С. Б. Киргизова,
О. О. Жеребятыева, Г. О. Махалова, Н. Ю. Кашук,
Д. Г. Укубаева

ГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Оренбург

Antagonistic particular of strains of Pseudomonas aeruginosa isolated at purulent-inflammatory diseases of reproductive tract

T. O. Fyodorova, E. A. Mikhailova, S. B. Kirgizova, O. O. Zherebyatyeva,
G. O. Makhlova, N. Yu. Kashchuk, D. G. Ukubaeva
Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

Значение антагонизма микробов в настоящее время определяется уровнем исследований, широко проводящихся во всех странах мира в генетическом, биохимическом и экологическом аспектах. Понятие об антагонизме основывается на современных представлениях о конкретных механизмах, которые весьма различны, несмотря на сходное фенотипическое выражение антагонистической активности микробов. Микробный антагонизм может обуславливать селективные преимущества продуцентов перед чувствительными к ним микробами и иметь значение в процессах формирования типов микробиоценоза человека и животных.

Цель исследования. Изучить антагонистические особенности штаммов синегнойной палочки, выделенных при гнойно-воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта.

Материалы и методы. В качестве испытуемых культур микроорганизмов были взяты 40 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из клинического материала при гнойно-воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта мужчин и женщин (цистит, уретрит, простатит, цервицит). Выделенные микроорганизмы подвергали идентификации по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам. Для исследования антагонистических свойств бактерий использовали методы прямого антагонизма по Murray (1950) в модификации Усвяцова (1967) и отсроченного антагонизма по Frederiq (1957). Индикаторными культурами послужили штаммы *E. Coli* (по 20 штаммов типичной и гемолитической *E. coli*), *S. aureus* (20 штаммов) и 40 штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из клинического материала при гнойно-воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта. Таким образом, определяли антагонистические отношения не только между неродственными микроорганизмами, но и внутривидовой антагонизм.

Результаты. Индикаторные тест-культуры были распределены в несколько групп: 1 — *S. aureus*; 2 — типичная *E. coli*; 3 — гемолитическая *E. coli*; 4 — *P. aeruginosa*. Результаты исследования показали, что наибольшая степень антагонистической активности штаммов синегнойной палочки наблюдалась в отношении индикаторных штаммов первой группы (91 %), где подавление роста составляло примерно $9,3 \pm 0,5$ мм. Подавление роста индикаторных штаммов второй группы в среднем составило $8,5 \pm 0,8$ мм, что наблюдалось в 75 % случаев. В отношении гемолитических *E. coli*, входящих в третью группу, антагонистической активностью синегнойная

палочка обладала примерно в 50 % случаев, где подавление роста культур составляло $7,6 \pm 0,5$ мм. В ходе исследования также была отмечена роль межвидового антагонизма штаммов синегнойной палочки (четвертая группа). Было установлено, что в 47 % случаев штаммы подавляли друг друга с диаметром зоны подавления роста примерно $8,7 \pm 0,5$ мм, причем отмечалось также подавление продукции пиоцианина, что можно было оценить визуально на питательной среде.

Выводы. Наибольшей антагонистической активностью штаммы *P. aeruginosa* обладали в отношении *S. aureus* и типичной *E. coli*. Установлено, что исследуемые штаммы синегнойной палочки способны подавлять рост друг друга, а также продукцию пиоцианина.

VII. Современные лабораторно-диагностические маркеры в оценке патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний

Гипергомоцистеинемия — независимый предиктор кардиоваскулярных осложнений у больных сахарным диабетом типа 2

А. Г. Денисова, Е. Р. Кулюцина, Т. А. Дружинина

ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Минздрава России, г. Пенза

Hyphomocysteinemia is an independent predictor of cardiovascular complications in patients with diabetes mellitus type 2

A. G. Denisova, E. R. Kulyutsina, T. A. Druzhinina
The Penza Institute for Postgraduate Study of Doctors, Penza, Russia

Множество исследований, проведенных в различных странах, продемонстрировали, что сахарный диабет типа 2 (СД2) является настолько мощным фактором риска развития кардиальной патологии, что его можно приравнять к эквивалентам ИБС. К одним из несомненных предикторов сердечно-сосудистых заболеваний относят гипергомоцистеинемия (ГГЦ).

Цель исследования. Оценить взаимосвязь гомотеина (ГЦ), гликозилированного гемоглобина, показателей липидного профиля у здорового населения и больных сахарным диабетом типа 2 (СД2) в сочетании с артериальной гипертензией (АГ), проживающих в Пензенской области.

Материалы и методы. В основную группу I ($n = 56$) вошли больные СД2 в сочетании с АГ. Длительность СД $6,7 \pm 3,4$ года, длительность АГ $12,3 \pm 3,5$ года. В группу контроля II ($n = 50$) включены доноры с нормальными значениями артериального давления без нарушения углеводного обмена. Средний возраст пациентов составил $59,8 \pm 4,3$ года. Концентрация ГЦ определялась иммуноферментным методом с использованием набора реактивов Axis-Shield Diagnostics Limited (Англия), гликозилированного гемоглобина на аппарате Clima (Испания), холестерина (ХС), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХСЛПВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХСЛПНП), триглицеридов с использова-

нием реактивов фирмы «Витал диагностикс» (Россия) на аппарате Conelab (Финляндия). Определяли средний уровень лабораторных показателей с пределами колебаний ($X \pm 2\sigma$). Частоту встречаемости (ЧВ) ГГЦ определяли прямым подсчетом. Различия в их распределении оценивали с помощью точного критерия Фишера. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. Корреляционный анализ проводился по критерию Спирмена.

Результаты. Средний уровень ГЦ в сыворотке крови у лиц контрольной группы составил $8,5 \pm 1,6$ мкмоль/л от 4,39 до 12,7 мкмоль/л. Концентрация ГЦ у больных СД2 составила в среднем $16,9 \pm 8,2$ мкмоль/л и была статистически значимо выше, чем в контрольной группе ($p = 0,00015$). Соответственно средний уровень ГЦ у женщин составил 16,8 мкмоль/л, у мужчин — 17,1 мкмоль/л. ЧВ ГГЦ (концентрация ГЦ выше 15 мкмоль/л у мужчин и выше 12 мкмоль/л у женщин) составила 82,6 % у больных СД2 с АГ. В отличие от этого в контрольной группе ГГЦ была выявлена у 23,3 % обследованных. Средний уровень гликозилированного гемоглобина у больных СД2 составил $8,41 \pm 0,2$ %. Средний уровень общего холестерина — $6,35 \pm 1,81$ ммоль/л, ХСЛПВП — $1,04 \pm 0,05$ ммоль/л, ХСЛПНП — 4,09 ммоль/л, триглицеридов — $3,32 \pm 0,2$ ммоль/л. При анализе взаимосвязи изучаемых показателей не выявлено статистически значимых корреляционных связей между концентрацией ГЦ и длительностью СД, уровнем гликированного гемоглобина, холестерина, ХСЛПВП, ХСЛПНП и триглицеридов.

Выводы. Отсутствие взаимосвязи гомоцистеина (ГЦ) и показателей, отражающих патогенетические механизмы развития СД2 (гликозилированный гемоглобин, липидный профиль) как у здорового населения, так и у больных сахарным диабетом типа 2 (СД2) в сочетании с артериальной гипертензией (АГ), проживающих в Пензенской области, свидетельствует, что гипергомоцистеинемия является независимым от других факторов риска предиктором кардиоваскулярных осложнений.

Костный обмен при хронической сердечной недостаточности

В. Н. Ларина, И. И. Чукаева, Д. Г. Карпенко, Т. Н. Распопова

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

Bone turnover in chronic heart failure

V. N. Larina, I. I. Chukaeva, D. G. Karpenko, T. N. Raspopova
The Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov, Moscow, Russia

Целью исследования явилась оценка состояния костного обмена у амбулаторных больных хронической сердечной недостаточностью (ХСН).

Материал и методы. В открытое сравнительное проспективное исследование были включены 70 амбулаторных больных (30 мужчин, 40 женщин) в возрасте от 56 до 88 лет ХСН. Группу сравнения составили 40 больных (10 мужчин, 30 женщин) в возрасте от 57 до 88 лет с заболеваниями сердечно-сосудистой системы без ХСН. Всем пациентам провели клинико-лабораторное обследование, эхокардиографию. Минеральная плотность костной тка-

ни (МПКТ) в поясничном отделе позвоночника и шейке бедренной кости оценивали методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии.

Результаты. Больные ХСН и группы сравнения были сопоставимы по основным демографическим показателям, наличию сопутствующих артериальной гипертензии, сахарного диабета, хронической болезни почек (ХБП), а также гемодинамическим показателям. По сравнению с группой больных без ХСН у больных ХСН чаще встречались ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда в анамнезе, гипертрофия ЛЖ и фибрилляция предсердий. Наблюдалось статистически значимое снижение концентрации витамина D в группе больных ХСН — 9,6 (5,0; 14,4) нг/мл по сравнению с таковой у больных без ХСН — 14,8 (10,4; 21,3) нг/мл ($p = 0,001$). Дефицит витамина D был выявлен у 42 (82,4 %) больных ХСН и у 20 (62,5 %) больных без ХСН ($p = 0,043$). Остеопороз (ОП) имелся у 61,4 % больных ХСН, остеопения у 20 %, нормальная МПКТ у 18,6 %. В группе сравнения ОП имел место у 32,5 %, остеопения у 42,5 %, нормальная МПКТ у 25 % больных. За период наблюдения (в среднем 26,5 месяца) переломы разных отделов скелета возникли у 24,3 % больных ХСН и у 7,5 % группы сравнения ($p = 0,028$). ОП был сопряжен с возрастом пациентов ($r = 0,36$; $p = 0,002$), длительностью ХСН ($r = 0,26$; $p = 0,039$), локомоторными падениями ($r = 0,29$; $p = 0,015$), переломами костей скелета ($r = 0,42$; $p < 0,001$), ХБП ($r = 0,24$; $p = 0,048$), уровнями N-концевого фрагмента мозгового натрийуретического фермента NT-proBNP ($r = 0,52$; $p = 0,007$) и скоростью клубочковой фильтрации ($r = -0,37$; $p = 0,010$). При однофакторном анализе ОП независимо ассоциировался с наличием ХБП (отношение шансов [ОШ] 3,1 при 95 % доверительном интервале [ДИ] от 1,1 до 8,8; $p = 0,032$), уровнем NT-proBNP (ОШ 9,8 при 95 % ДИ от 1,1 до 8,9; $p = 0,043$) и частыми падениями больных (ОШ 4,0, 95 % ДИ от 1,3 до 12,7; $p = 0,019$).

Выводы. Ассоциация высокого уровня NT-proBNP и нарушенной функции почек со сниженной МПКТ позволяет рассматривать последнюю в качестве самостоятельного маркера тяжести ХСН, что подтверждает необходимость своевременного выявления ОП у больных ХСН и позволяет рассматривать больных ХСН как группу риска возникновения ОП и связанных с ним переломов.

Лабораторная диагностика митохондриальной дисфункции и лечение препаратами кофермента Q_{10}

А. Г. Мишура, Г. Г. Родионов

СПбГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн», ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова» (ВЦЭРМ) МЧС России; г. Санкт-Петербург

Laboratory diagnosis of mitochondrial dysfunction and treatment with coenzyme Q_{10}

L. G. Mishura, G. G. Rodionov
The Hospital for Veterans of Wars; the All-Russian Centre for Emergency and Radiation Medicine n.a. A. M. Nikiforov; Saint Petersburg, Russia

Введение. В последние годы исследователи все больше уделяют внимания роли МД при сердечно-сосудистых заболеваниях, признавая за ней одну из ведущих ролей. Были проведены ряд исследований, в которых была

показана потенциальная эффективность энерготропной терапии при ОКС. Однако клиническая эффективность при лечении нарушений функции комплексов дыхательной цепи доказана только для препаратов CoQ_{10} . Развитие медицинской науки в этом направлении требует внедрения новых методов лабораторного обеспечения диагностики и таргетной терапии МД на уровне клинико-диагностических лабораторий многопрофильных стационаров.

Цель и задачи исследования. Изучить активность комплексов дыхательной цепи митохондрий лимфоцитов крови у лиц пожилого возраста с МД на фоне острого ИМ и влияние CoQ_{10} на активность этих комплексов в опыте *in vitro*.

Материалы и методы. В исследование были включены 25 пациентов с острым инфарктом миокарда (госпитализированных на 2–3-й сутки заболевания) в возрасте от 60 до 85 лет, проходивших лечение в СПбГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн» в 2015 году, из которых мужчин было 8 (33,3%) и 17 (66,7%) женщин. Группу сравнения (без ОИМ) составил 61 человек в возрасте от 50 до 75 лет (15 мужчин [24,6%] и 46 женщин [75,4%]). Инкубацию лимфоцитов с препаратом CoQ_{10} Кудесан в различных концентрациях проводили в течение одного часа в фосфатном буфере (0,154 М NaCl; pH=7,4; +37 °C), после чего клетки трижды отмывали фосфатным буфером и гомогенизировали. В гомогенате лимфоцитов определяли активность комплексов дыхательной цепи (I–IV), ЛДГ, каталазы и СОД, концентрацию лактата (анализаторы KONE Specific Basic и Cobas Integra 400 Plus). При статистической обработке рассчитывали среднее арифметическое и стандартное отклонения. Достоверность различий средних оценивали, используя t-критерий Стьюдента и критерий U-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. При расчетах использовали программный пакет PASW Statistics 18.

Результаты и обсуждения. У пациентов без ОИМ активность комплексов дыхательной цепи составила: I (комплекс) $6,54 \pm 0,92$ МЕ/г (белка); I–III $2,17 \pm 0,93$ МЕ/г; II–III $6,77 \pm 1,07$ МЕ/г; IV $5,24 \pm 0,92$ МЕ/г. У всех пациентов с ОИМ были выявлены выраженные нарушения функции дыхательной цепи, и диагностированы средняя и тяжелая степени митохондриальной дисфункции со снижением активности комплекса IV (последнего) более чем в два раза. В лимфоцитах пациентов с ОИМ до воздействия различных концентраций CoQ_{10} активность комплексов дыхательной цепи составила: I (комплекс) $9,73 \pm 2,14$ МЕ/г (белка); I–III $2,09 \pm 0,34$ МЕ/г; II–III $5,05 \pm 1,00$ МЕ/г; IV $2,77 \pm 0,83$ МЕ/г. При воздействии препарата Кудесан с концентрацией CoQ_{10} , близкой к «терапевтической» (0,0024 мкмоль/мл), активность I комплекса дыхательной цепи снижалась на 40% (увеличение чувствительности к ротенону на 30%), активность функционального комплекса I–III возрастала на 21%, активность функционального комплекса II–III значительно не менялась, активность IV комплекса возрастала на 48%. Отношение активности ЛДГ к активности IV дыхательного комплекса уменьшилось на 200%, активность ЛДГ снижалась на 36%. Активность СОД и каталазы снижалась соответственно на 39% и 30%. При увеличении концентрации CoQ_{10} (Кудесан) в пять раз (0,0121 мкмоль/мл) активность I комплекса дыхательной цепи снижалась на 32%, (увеличение чувствительности к ротенону на 33%)

активность комплексов I–III и II–III достоверно не изменялась, активность комплекса IV малозначимо уменьшалась (на 10%). Отношение активности ЛДГ к активности IV дыхательного комплекса значимо не менялось, активность ЛДГ снижалась на 17%. Активность СОД и каталазы значимо не менялась. При увеличении концентрации CoQ_{10} (Кудесан) в 10 раз (0,024 мкмоль/мл) активность I комплекса дыхательной цепи снижалась на 53% (увеличение чувствительности к ротенону на 28%), активность комплекса I–III уменьшалась на 10%, активность комплексов II–III и IV значимо не менялась. Отношение активности ЛДГ к активности IV дыхательного комплекса и активность ЛДГ менялись малозначительно. Активность СОД и каталазы не изменялась. Эти данные позволяют судить, что при краткосрочном воздействии CoQ_{10} в «терапевтической» концентрации (0,0024 мкмоль/мл) происходит оптимизация энергетического метаболизма клеток пациентов с выраженной МД на фоне острого ИМ: стимулирование работы дыхательной цепи, снижение утечки электронов из нее, что сопровождается увеличением синтеза АТФ за счет окислительного фосфорилирования и уменьшением доли гликолиза в энергетическом метаболизме.

Выводы. Использование в качестве маркера МД изменения активности ферментных комплексов ЦПЭ митохондрий лимфоцитов позволяет выявить лабораторные признаки митохондриальной дисфункции у всех пациентов с острым ИМ в условиях патогенетической терапии. Препараты CoQ_{10} оказывают дифференцированное модулирующее действие на энергетический метаболизм лимфоцитов пациентов с острым ИМ в условиях патогенетической терапии в опытах *in vitro*. Наиболее выраженный эффект на дыхательную цепь обнаружен при воздействии концентрации CoQ_{10} , близкой к «терапевтической» (0,0024 мкмоль/мл). При этом активность I комплекса снижалась на 30–50%, комплекса I–III возрастала на 15–30%, IV комплекса увеличивалась на 35–60%, а активность ЛДГ снижалась на 30–45%. Определение активности комплексов ЦПЭ митохондрий лимфоцитов может быть использовано в реализации принципов доказательной и персонализированной медицины.

Анализ экспрессии маркеров фиброза миокарда в мезенхимных стромальных клетках костного мозга после острого ишемического воздействия

М. В. Пузанов, Р. И. Дмитриева, А. А. Карпов, О. В. Сироткина

ФБГУЗ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Analysis of expression of myocardial fibrosis markers in bone marrow-derived mesenchymal stromal cells after acute ischemic influence

M. V. Puzanov, R. I. Dmitrieva, A. A. Karpov, O. V. Sirotkina
The North-West Federal Medical Research Centre n.a. V. A. Almazov, Saint Petersburg, Russia

Введение. Исследование механизмов активации регенеративного потенциала мезенхимных стромальных клеток костного мозга (МСК-КМ) в процессе репарации поврежденной ткани является важным этапом как для

лучшего понимания патогенеза хронической сердечной недостаточности, так и для разработки новых эффективных методов клеточной терапии дегенеративных нарушений различных тканей. Под контролем факторов, секретируемых МСК, находится восстановление коллагенового каркаса поврежденного участка органа, причем при возникновении повреждения МСК подавляют синтез в ткани матриксных металлопротеаз, секретируя их ингибиторы — белки семейства TIMP. В процессе дальнейшего восстановления поврежденной ткани уровень TIMP снижается, стимулируя синтез MMP в резидентных фибробластах, обеспечивая эффективное ремоделирование ткани и подавляя ее фиброз, в том числе и в процессе ремоделирования ткани миокарда после инфаркта.

Цель. Разработать методику оценки влияния мезенхимных стромальных клеток костного мозга на процесс восстановления ткани миокарда после острого ишемического воздействия, а также на формирование фиброза в постинфарктном миокарде.

Материалы и методы. Для моделирования постинфарктной сердечной недостаточности используются крысы-самцы линии Wistar. Наиболее предпочтительной моделью, отличающейся хорошей воспроизводимостью, и отражающей основные патофизиологические механизмы постинфарктного ремоделирования сердца, является модель наложения лигатуры на левую коронарную артерию (ЛКА). Через 14 суток после проведения острого инфаркта миокарда у крыс ($n = 5$) забирали костный мозг. В качестве контрольных использовали образцы МСК-КМ от здоровых интактных крыс ($n = 5$). Культуру МСК из костного мозга получали в градиенте адгезии на культуральную поверхность. Клетки культивировали в стандартных условиях культивирования (5% CO_2 ; $+37^\circ\text{C}$) в полной культуральной среде. После второго пассажа из МСК выделяли РНК с использованием реагента TRIzol Reagent по протоколу производителя. Обратную транскрипцию РНК производили с использованием набора реактивов High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit согласно протоколу производителя. В качестве мишеней для экспрессионного анализа были выбраны гены TIMP1 и MMP2. Анализ экспрессии проводили методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени. В состав реакционной смеси общим объемом 25 мкл входили: 13 мкл стерильной воды, 5 мкл ДНК-матрицы после высокоэффективного ревертирования, 5 мкл раствора qPCRmix-HSSYBR+LowROX, по 1 мкл прямого и обратного праймера к исследуемым генам. Реакцию проводили в течение 30 циклов инкубации в ПЦР-амплификаторе с детекцией результатов амплификации в режиме реального времени. В качестве количественного параметра оценивали отношение количества кДНК исследуемых генов к количеству кДНК гена домашнего хозяйства (HPRT). Для выявления внутрилабораторной сходимости метода, эксперимент повторяли на одних и тех же образцах три раза.

Результаты. Нами была предложена методика оценки экспрессии маркеров фиброза в МСК-КМ в модели постинфарктной сердечной недостаточности. Показана внутрилабораторная сходимость лабораторной методики:

при повторении эксперимента три раза результаты экспрессии генов TIMP1 и MMP2 не имели существенных различий: отношение экспрессии гена MMP2 в образцах исследуемых животных к таковой в контрольных образцах в первом, втором и третьем опытах составило 1,1, 1,0 и 1,0 раза соответственно; отношение экспрессии гена TIMP1 в образцах исследуемых животных к таковой в контрольных образцах в первом, втором и третьем опытах составило 1,0, 0,8 и 0,8 раза соответственно. Таким образом, нами не было выявлено существенных различий в экспрессии генов-регуляторов фиброза в МСК-КМ на 14-е сутки после острого ишемического воздействия.

Выводы. Предложенная нами методика может быть использована для анализа маркеров фиброза в МСК-КМ в процессе регенерации миокарда, так как показана ее внутрилабораторная сходимость. На 14-е сутки после ишемического воздействия МСК-КМ не изменяют экспрессию генов-регуляторов фиброза.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-32221 «Исследование молекулярных механизмов активации регенеративного потенциала мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга при дегенеративных нарушениях, в том числе при сердечной недостаточности», руководитель М. В. Пузанов.

VIII. Проблемы гемостаза, тромбоза и гемореологии в клинической практике

Оценка коагуляционной активности на фоне профилактики дабигатраном после крупных ортопедических операций: рутинные тесты, молекулярные маркеры, тромбоэластография

И. П. Антропова

ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, ГБУЗ СО «Центр специализированной высокотехнологической медицинской помощи „Уральский институт травматологии и ортопедии имени В. Д. Чаклина“»; г. Екатеринбург

Assessment of coagulation routine tests and molecular markers in during antithrombotic prophylaxis with dabigatran after major orthopedic surgery

I. P. Antropova

Ural State Medical University; the Center for Specialized High-Tech Medical Care — the Ural Institute for Traumatology and Orthopedics n.a. V. D. Chaklin; Ekaterinburg, Russia

Хирургические вмешательства в ортопедии связаны с высоким риском тромбоэмболических осложнений. Существенную роль в развитии таких осложнений играет активация коагуляционных процессов, поэтому приоритетным профилактическим направлением является фармакологическая коррекция коагуляционного звена гемостаза. В настоящее время для этой цели широко используется новый оральный антикоагулянт дабигатран, специфически блокирующий свободный и связанный с кровяным

сгустком тромбин, благодаря чему ингибируется не только образование фибрина, но и активация тромбоцитов.

Цель работы. Используя различные методы лабораторных исследований, изучить гемокоагуляционные изменения на фоне стандартной профилактики дабигатраном у пациентов, перенесших эндопротезирование коленного сустава (ЭКС).

Материал и методы. В исследование были включены 30 пациентов в возрасте от 42 до 74 лет, средний возраст 61,0 года. Дабигатрана этексилат назначался по стандартной схеме: вечером после операции 110 мг, затем в течение 14 дней по 220 мг. Образцы венозной крови забирали утром натощак в пробирку с 3,2-процентным раствором цитрата натрия за 1–2 суток перед операцией, через 30 минут, на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е сутки после ЭКС. Определяли: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПТВ), тромбиновое время (ТВ), концентрацию фибриногена (ФГ), фибринопептида А (ФПА), Д-димера (Д-Д), количество тромбоцитов. Тромбоэластографически (TEG 5000) определяли показатели R, Ang, MA, CI. Статистический анализ проводили с использованием критерия Фридмана (послеоперационная динамика), критерия Вилкоксона (сравнение послеоперационных данных с исходными значениями), корреляционного анализа. Для расчетов использовалась программа Statistica 8.0.

Результаты. Анализ результатов лабораторных тестов выявил существенные послеоперационные изменения для всех изученных показателей. Максимум фибринообразования приходится на самый ранний послеоперационный период, после чего наблюдается устойчивая тенденция возвращения коагуляционной активности к исходному состоянию. Об этом свидетельствует концентрация ФПА — продукта протеолитической деградации фибриногена тромбином и специфического маркера фибринообразования. В противоположность этому концентрация Д-Д в послеоперационном периоде имеет несколько фаз: повышение в первые сутки, значительный сдвиг к нормализации к третьим суткам, повторное существенное повышение к седьмым суткам с сохранением высокого уровня не менее двух недель. Данные различия объясняются тем, что Д-Д является маркером не только образования фибрина, но и его лизиса. При операции повышение литической активности способствует ограничению распространения коагуляционного процесса за пределы травмированной области, повторное усиление фибринолиза является репаративным и обеспечивает растворение фибрина в процессе восстановления поврежденного сосуда. Мощная интраоперационная активация коагуляции сопровождается потреблением тромбоцитов и факторов свертывания. Количество циркулирующих тромбоцитов снижено в течение трех суток после хирургического вмешательства, с седьмых суток и до конца периода исследования их уровень значительно нарастает. Реактивное повышение количества тромбоцитов в крови индуцируется периоперационной потерей крови и послеоперационной воспалительной реакцией. Компонентом послеоперационных реакций острой фазы воспаления является также опосредованная цитокинами усиленная продукция гепатоцитами фибриногена. Концентрация ФГ достигает максимума к третьим суткам

и остается повышенной до конца периода исследования. Показано, что по окончании операции быстрое и мощное усиление формирования фибрина не сопровождается настолько же выраженными гиперкоагуляционными изменениями тромбоэластографических показателей. Вместе с тем снижение интенсивности фибринообразования с первых суток после ЭКС происходит на фоне нарастания плотности сгустка крови (МА) и общего коагуляционного индекса (CI). Наблюдаемую динамику изучаемых показателей можно объяснить тем, что молекулярный маркер фибринообразования ФПА свидетельствует главным образом о процессах, происходящих в месте повреждения сосуда, тогда как тромбоэластография отражает состояние крови в целом. Корреляционный анализ показал, что увеличение плотности сгустка (МА) и повышение общего коагуляционного потенциала (CI) тесно связаны с послеоперационным повышением количества циркулирующих тромбоцитов и гиперфибриногенемией. Удлинение АЧТВ, ПТВ и ТВ наблюдается уже по окончании хирургического вмешательства и сохраняется до конца периода исследования. На фоне действия дабигатрана нормализации рутинных коагуляционных тестов не происходит, поскольку они имеют зависимость от уровня тромбина и чувствительны к действию его ингибитора. Тромбоэластографическое исследование обнаружило, что показатель R, характеризующий латентный, ферментативный этап свертывания, значительно удлиняется после ЭКС на фоне ингибирования тромбина дабигатраном. Корреляционный анализ выявил наличие в послеоперационном периоде прямой значимой связи между АЧТВ и R, а также обратной связи между АЧТВ и активностью формирования сети фибрина (Ang).

Выводы. Тромбоэластография и рутинные клоттинговые тесты не имеют связи со специфическим маркером фибринообразования на фоне профилактики дабигатраном после ЭКС. Формирование фибрина наиболее интенсивно происходит по окончании эндопротезирования, после чего постепенно возвращается к исходному уровню, тогда как общий коагуляционный потенциал крови после операции нарастает и остается повышенным не менее двух недель, следуя за увеличением количества тромбоцитов и фибриногена в крови. Ассоциированность с ферментативным этапом свертывания, а также со скоростью образования фибриновой сети при формировании сгустка крови дает основание предположить информативность АЧТВ в выявлении патологических гипокоагуляционных сдвигов при антитромботической профилактике дабигатраном.

Васкулоэндотелиальный фактора роста, фактора роста фибробластов и трансформирующий фактор роста $\beta 1$ в прогнозе рестенозов коронарных артерий у пациентов, подвергшихся чрескожным коронарным вмешательствам

Е. Ю. Васильева

ФБГУЗ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor and transforming growth factor β 1 in patients with coronary heart disease after percutaneous coronary surgery.

E. Yu. Vasilyeva

The North-West Federal Medical Research Centre n.a. V.A. Almazov, Saint Petersburg, Russia

В качестве перспективных лабораторных маркеров состояния сосудистого эндотелия, стабильности атеросклеротической бляшки и прогрессирования атеросклероза активно изучаются представители различных семейств ростовых факторов. Содержание ростовых факторов влияет на процессы ангиогенеза, пролиферации и миграции клеток, что может быть решающим в поздних осложнениях чрескожных коронарных вмешательств с формированием рестенозов оперированных артерий или прогрессированием атеросклероза в других сегментах.

Цель. Определение диагностической значимости ростовых факторов для прогнозирования риска развития неблагоприятных коронарных событий у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) в течение года после стентирования коронарных артерий.

Материалы и методы. Данная работа проведена как проспективное наблюдательное аналитическое исследование по типу «случай — контроль», в основную группу которого был включен 71 пациент с хронической формой ИБС с показаниями к операции реваскуляризации миокарда, 15 женщин и 56 мужчин в возрасте от 41 до 75 лет (средний возраст $58,5 \pm 13,3$ года), которым было в последующем выполнено стентирование коронарных артерий. Контрольная группа: 33 практически здоровых донора, сопоставимых по полу и возрасту без клинических проявлений ИБС. По результатам годичного проспективного наблюдения при условии стандартной терапии пациенты были разделены на две группы: I группа ($n = 58$) с благоприятным течением отдаленного послеоперационного периода, II группа ($n = 13$) — больные, у которых в течение года развился рестеноз коронарных артерий в зоне операции или другом сегменте. Всем включенным в исследование была измерена концентрация васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF-A), фактора роста фибробластов (FGF basic) и трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1) в сыворотке методом иммуноферментного анализа с помощью планшетного ридера BioRad (США). Образцы венозной крови брали у пациентов в первые сутки пребывания в стационаре до вмешательства.

Результаты. Значения концентрации TGF- β 1 и FGF basic были существенно ниже в группе пациентов с ИБС по отношению к группе контроля ($17388,94 \pm 3360,9$ против $37843 \pm 3363,72$ пг/мл и $3,17 \pm 0,57$ против $9,42 \pm 1,18$ пг/мл соответственно; $p < 0,05$). Вероятным объяснением может быть потребление и (или) истощение продукции факторов роста при активном атеросклеротическом процессе. В то же время концентрация VEGF-A в группе больных ИБС была достоверно выше ($347,3 \pm 141,09$ против $224,8 \pm 155,83$ пг/мл; $p < 0,05$), что объясняется значительной его экспрессией в активированных макрофагах, эндотелиальных и гладкомышечных клетках на фоне прогрессирующего атеросклеротического процесса. В группах больных с различными клиническими

результатами в отдаленные сроки после вмешательства (развитие рестенозов или неосложненное течение) анализ дооперационной концентрации факторов роста не показал значимых отличий.

Выводы. У больных, страдающих хронической формой ИБС, отмечается снижение концентрации фактора роста фибробластов и трансформирующего фактора роста- β 1 и увеличение концентрации васкулоэндотелиального фактора роста по сравнению со здоровыми донорами. Корреляции этих изменений с исходами хирургического лечения (стентирование коронарных артерий) в течение года не выявлено. Необходимо продолжение проспективного наблюдения с динамической оценкой содержания факторов и увеличением выборки больных.

Связь генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушением метаболизма фолатов и риском тромбофилии с уровнем гомоцистеина у беременных с хронической болезнью почек

И. О. Жегулина, С. Г. Жегулина, М. И. Сидоркина, И. Г. Никольская, Т. С. Будикина

НКЦ генетики и персонализированной медицины Atlas Biomed Group, г. Москва; ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», г. Москва; ООО ЦЭМ «Бьюти дерм», Калининград

Relationship between genetic polymorphisms associated with folate metabolism disturbances and risk of thrombophilia and homocysteine level among pregnant women with chronic kidney disease

I. O. Zhegulina, S. G. Zhegulina, M. I. Sidorkina, I. G. Nikolskaya, T. S. Budykina

The Atlas Biomed Group Co., Moscow; the Moscow Region Scientific and Research Institute for Obstetrics and Gynecology, Moscow; The Beauty Derm Co., Kaliningrad; Russia

В последнее время активно изучается связь генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушением метаболизма фолатов с рисками заболеваний сердечно-сосудистой системы, опухолевыми и нейродегенеративными заболеваниями. Наличие патологических аллелей ферментов, регулирующих обмен фолиевой кислоты, а также концентрацию гомоцистеина и метионина в крови, прежде всего метилентетрагидрофолат-редуктазы (МТГФР), считается фактором риска развития преэклампсии, фетоплацентарной недостаточности, ранних родов. Влияние на сердечно-сосудистую систему в значительной степени опосредовано повышением концентрации гомоцистеина (ГЦ) в крови, который активирует свертывающую систему и адгезионную активность тромбоцитов, увеличивает риск атеросклероза. Концентрация ГЦ в крови является биохимическим маркером адекватного метаболизма фолиевой кислоты и метионина, причем влияет на этот процесс не только генетический статус пациента, но и условия жизни, а также наличие сопутствующих заболеваний. Алиментарный дефицит витаминов (B_6 , B_{12} , фолиевой кислоты), а также нарушение их всасывания вследствие заболеваний желудочно-кишечного тракта могут приводить к гипергомоцистеинемии. Помимо этого, повышение концентрации ГЦ может быть следствием почечной недостаточности, алкоголизма, сахарного диабета.

До настоящего времени не проводилось исследований по изучению частоты однонуклеотидных полиморфизмов генов фолатного обмена среди беременных с нарушением функции почек.

Цель. Определить связь между наличием полиморфизма генов МТГФР, уровнем ГЦ в венозной крови и стадией ХБП у беременных.

Материалы и методы. Были обработаны результаты обследования 267 беременных женщин с хронической болезнью почек (ХБП), наблюдавшихся и родоразрешенных в 2014–2015 годах в МОНИАГ. Всем женщинам было проведено исследование крови на наличие генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла (в локусе C677T гена МТГФР), а также полиморфизма генов, ассоциированных с риском тромбофилии (FV, FII, PAI-1), которые увеличивают риск возникновения осложнений беременности и патологии плода. Исследование проводилось методом ПЦР в реальном времени с аллель-специфичными флуоресцентными зондами. Контрольную группу составили 86 здоровых беременных женщин.

Результаты. Частота встречаемости полиморфизма гена МТГФР в контрольной группе составила 15 %. У беременных с ХБП встречаемость полиморфизма данного локуса значительно выше, 55 %. При сравнительном анализе локуса C677T гена МТНFR выявлено достоверное увеличение частот генотипов СТ и ТТ в группе беременных с ХБП по сравнению с контрольной группой (в 10 раз по генотипу ТТ и в три раза по генотипу СТ); $p < 0,05$. Также частота полиморфизма гена ингибитора активатора плазминогена (PAI-1), ассоциированного с риском тромбофилии выше в группе беременных с ХБП в 1,7 раза по сравнению с группой контроля (70 и 42 % соответственно). При анализе межгенных взаимодействий выявлена сильная связь между наличием полиморфизмов в генах МТГФР и PAI-1, обладающими синергизмом влияния на течение нефрологического процесса. Практически у каждой второй пациентки с ХБП выявлено наличие мультигенных полиморфизмов (45,3 %). Средние значения ГЦ в обеих исследованных группах не выходили за границы нормы 5–15 мкмоль/л. Известно, что во время беременности уровень ГЦ существенно снижается и в среднем не превышает 3–5 мкмоль/л. По нашим данным, уровень ГЦ в группе контроля составил $5,9 \pm 0,5$ мкмоль/л. В группе беременных с ХБП наблюдается достоверное возрастание уровня ГЦ при прогрессировании заболевания. Так, при ХБП I степени ГЦ составил $7,62 \pm 0,45$ мкмоль/л, при ХБП II степени — $8,37 \pm 1,29$ мкмоль/л, при ХБП III–IV степеней — $12,21 \pm 0,55$ мкмоль/л. По данным дисперсионного анализа, отсутствует статистически достоверная вариабельность уровня общего ГЦ в крови по генотипу во всех исследуемых группах. Однако имеется тенденция к повышению уровня ГЦ в зависимости от генотипа по локусу C677T в гене МТНFR. Фермент МТГФР регулирует не только концентрацию ГЦ в крови, но и процессы метилирования, а также обмен фолиевой кислоты в организме. Снижение активности МТГФР тормозит цикл превращения ГЦ в метионин, что, с одной стороны, должно вызывать повышение концентрации ГЦ в крови.

Однако не стоит забывать о других путях утилизации ГЦ в организме. Почки ГЦ выводятся в минимальных количествах, 6–10 мкмоль в сутки. Тем не менее увеличение почечного кровотока, а также снижение реабсорбции ГЦ в почечных канальцах могут увеличивать скорость его выведения, чем и объясняется отсутствие гипергомоцистемии в группе здоровых беременных. При поражении почек, особенно при наличии почечной недостаточности (ХБП III–IV степеней) данный путь утилизации ГЦ нарушается, что приводит к достоверному повышению уровня ГЦ по мере прогрессирования ХБП.

Выводы. 1) Генотипы СТ и ТТ полиморфного варианта C677T гена МТНFR, а также генотипы 4G4G и 4G5G гена PAI-1 встречались чаще в группе беременных с ХБП по сравнению с группой контроля. Отмечена повышенная частота встречаемости мультигенных полиморфизмов у беременных с ХБП. 2) Концентрация ГЦ в крови в исследуемых группах не выходила за границы референсных значений. Наблюдалась тенденция к повышению уровня ГЦ у женщин с генотипами СТ и ТТ по локусу C677T в гене МТНFR. Отмечена четкая зависимость уровня ГЦ от стадии ХБП — достоверное возрастание ГЦ по мере прогрессирования заболевания.

Референсные интервалы лабораторных тестов коагуляции в динамике физиологической беременности и их клиническое использование

Т. Ю. Иванец, М. А. Виноградова, Н. В. Долгушина

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова» Минздрава России, г. Москва

Reference intervals for coagulation laboratory tests during physiological pregnancy and their clinical application

T. Y. Ivanets, M. A. Vinogradova, N. V. Dolgushina

The Scientific and Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology n.a. V. I. Kulakov, Moscow, Russia

Цель. Сформировать референсные интервалы для коагуляционных лабораторных тестов в зависимости от срока физиологической беременности.

Материалы и методы. В исследование были включены 828 женщин в возрасте 21–39 лет с одноплодной неосложненной беременностью. Все беременности завершились своевременными родами и рождением здорового ребенка. Послеродовый период протекал без осложнений. Пациентки были распределены на шесть подгрупп в зависимости от гестационного срока (4–8, 9–13, 14–20, 21–27, 28–34 и 35–40 недель). Критериями исключения были нарушения гемостаза (патологические кровотечения, тромботические состояния) в анамнезе и в течение данной беременности, протеинурия, артериальная гипертензия, преэклампсия. В контрольную группу вошли 125 небеременных женщин в возрасте 19–39 лет. Были оценены восемь наиболее часто используемых гемостазиологических лабораторных тестов: протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), активность антитромбина III (АТIII), протеина С, концентрация фибриногена, D-димера, фактора Виллебранда (ФВ). Исследования про-

водились на автоматическом анализаторе STA-Compact (Diagnostica Stago, Франция) клоттинговыми, хромогенными и иммунотурбидиметрическими методами. Референсные интервалы (2,5 и 97,5 перцентили) для этих показателей были вычислены согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии (IFSS) и требованиям Института клинических лабораторных стандартов (CLSI) C23-A2 по статистической обработке референсных значений.

Результаты. При анализе данных, полученных для разных сроков беременности, изменения были выявлены в большинстве тестов по сравнению с контрольной группой небеременных женщин ($p < 0,05$). При сравнении исследуемых групп было показано, что в сроке более 13 недель медианы ПВ, АЧТВ и ТВ были достоверно короче, чем в более ранние сроки. Значения медиан для фибриногена, фактора Виллебранда и D-димера достоверно возрастали с увеличением гестационного срока и достигали максимальных значений в третьем триместре, превышая к концу беременности исходный уровень (до беременности) в 1,6; 2,5 и 4,2 раза соответственно. При оценке уровня АТIII были отмечены значимо более низкие значения медианы на 35–40-й неделях беременности. Значения медиан уровня протеина С были на сроке 14–20 недель достоверно выше, чем в других группах беременных. В результате были получены референсные интервалы для ПВ, АЧТВ, тромбинового времени, фибриногена, ФВ, D-димера, антитромбина III и протеина С для данных сроков беременности.

Выводы. Таким образом, в результате данной работы было показано, что при оценке результатов коагуляционных тестов у беременных женщин необходимо использовать специальные референсные интервалы. Кроме того, необходимо использовать референсные значения, рассчитанные для каждого гестационного срока. Использование у беременных референсных значений для небеременных женщин может привести к неправильной интерпретации гемостазиограммы. Полученные данные могут быть использованы в других клинко-диагностических лабораториях, работающих на аналогичном оборудовании и реагентах, после соответствующей валидации, проводимой согласно требованиям Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI). Предполагается, что любая лаборатория может использовать референсные интервалы как свои собственные, если при тестировании 20 образцов со сходными клиническими характеристиками не более двух результатов выходят за границы данных референсных интервалов.

Изменение гемостатических свойств тромбоцитов при хранении тромбоцитных концентратов

И. М. Колесникова¹, Е. В. Ройтман², О. В. Карпова^{3,4}, С. А. Румянцев¹

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, ²ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, ³ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница № 52» Департамента здравоохранения

г. Москвы, ⁴ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России; г. Москва

Change of hemostatic properties of platelets during storage of platelet concentrates

I. M. Kolesnikova¹, E. V. Roitman², O. V. Karpova^{3,4}, S. A. Rumyantsev¹

¹The Federal Research and Clinical Centre for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. Dmitry Rogachyov; ²The Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov; ³The City Clinical Hospital № 52; ⁴The Federal Research and Clinical Centre for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. Dmitry Rogachyov; Moscow, Russia

Введение. Важнейшим критерием клинической эффективности трансфузий тромбоцитных концентратов (ТК) является купирование имеющихся у пациента геморрагических проявлений. Неэффективные с этой точки зрения трансфузии ТК могут быть обусловлены снижением функциональной активности консервированных тромбоцитов.

Цель. Изучение гемостатических свойств и метаболической активности тромбоцитов в процессе хранения.

Материалы и методы. Проанализированы 26 образцов ТК заготовленных аферезно в 100% аутоплазме (ТК-П) и 24 аферезных образца ТК, заготовленных с заменой 60–70% аутоплазмы на добавочный раствор (SSP+, Macopharma, France) (ТК-ДР). Исследования ТК проводили в день заготовки, через 24 часа, а также на третьи и пятые сутки хранения. Для характеристики гемостатических свойств ТК применяли агрегатометрию (индукторы АДФ, коллаген и ристомидин) и модифицированную тромбоэластографию. Кроме того, во всех образцах регистрировали концентрацию глюкозы, лактата и величину pH, а также степень спонтанной активации и апоптоза тромбоцитов по проценту Р-селектин (CD62P) и фосфатидилсерин (аннексин V) положительных тромбоцитов. Значения показателей в группах были охарактеризованы медианой и ее доверительным интервалом (доверительный интервал 95%). Различия между группами оценивали с помощью критерия Манна-Уитни, различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (MedCalc Software, Belgium).

Результаты. В ТК-П на пятые сутки хранения агрегационный ответ тромбоцитов к АДФ снизился на 44%, к коллагену на 29,5%, к ристомидину на 40,4%, процент Р-селектин положительных тромбоцитов вырос в 4,5 раза (по сравнению с днем заготовки), а содержание фосфатидилсерин положительных тромбоцитов было 1,2 раза больше, чем в ТК-ДР. В ТК-ДР на пятые сутки хранения регистрировалось падение агрегационной активности в ответ на все индукторы (к АДФ на 44%, к коллагену на 30%, к ристомидину на 26%), а процент Р-селектин положительных тромбоцитов вырос в 3,2 раза (по сравнению с днем заготовки). Концентрация глюкозы к пятым суткам хранения снизилась в ТК-П на 48,6%, а в ТК-ДР на 75% по сравнению с днем заготовки, при нарастании концентрации лактата к пятым суткам хранения концентрация возросла в шесть раз в ТК-П и в 6,9 раза в ТК-ДР. При этом величина pH практически не изменялась, что свидетельствовало о достаточной компенсаторной мощности буферных систем. В процессе хранения ТК-П отмечено ухудшение упругости, деформационных свойств и качества сгустка в целом (снижение показателей Angle на 30%, MA на 9%, G на 24%), при этом влияние активированных тромбоцитов на свойства сгустка утрачивалось

к третьим суткам хранения. В ТК-ДР со дня заготовки и до трех суток также наблюдалось снижение упругих и деформационных свойств сгустка (уменьшение значений показателей Angle на 19%, МА на 13%, G на 29%). Однако в ТК-ДР влияние активированных тромбоцитов на свойства сгустка отсутствовало на протяжении всего срока хранения, что может объясняться проявлением консервирующего эффекта добавочного раствора.

Выводы. Процедура афереза тромбоцитов сопровождается выраженной депрессией агрегационно-адгезионной активности, однако ТК, заготовленные с использованием добавочного раствора, лучше сохраняют агрегационную активность в процессе хранения. Вне зависимости от способа заготовки тромбоциты сохраняют высокую метаболическую активность на протяжении всего срока хранения. Мы полагаем, что гемостатические свойства, как интенсивность сгусткообразования, общее качество сгустка, его упругость и деформируемость, формируются в момент заготовки ТК. Последующее ухудшение качества сгустка не связано напрямую с агрегационной и адгезионной способностью тромбоцитов, а зависят от иных факторов, по-видимому, вследствие снижения в процессе хранения секреции тромбоцитарных гранул, синтеза тромбосана А2 и ослаблением межтромбоцитарного взаимодействия. Полученные данные позволяют предположить, что гемостатический эффект трансфузий ТК будет зависеть от способности тромбоцитов восстановить свою функциональную активность, попав в организм пациента.

Различия лабораторных показателей реактивности тромбоцитов по результатам тестов ARU VerifyNow для различных форм АСК у пациентов с ИБС после коронарного стентирования

А. Д. Котвицкий¹, И. В. Першуков², С. В. Осташенко³, Т. Н. Кузнецова³, А. А. Омаров⁴, Джафар Мамед-оглы Рамазанов⁵, З. А. Карбен⁶, С. Н. Щербо¹, Т. А. Батыралиев⁶, Б. А. Сидоренко²

¹ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва; ²ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента России, г. Москва; ³БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1», г. Воронеж; ⁴РГП «Научно-исследовательский институт кардиологии и внутренних болезней» Минздрава Казахстана, Алматы, Казахстан; ⁵Центральная больница нефтяников Минздрава Азербайджана, Баку, Азербайджан; ⁶Медицинский университет САНКО, Газиантеп, Турция

Differences in laboratory parameters of platelet reactivity according to ARU VerifyNow test results for different forms of ASA in patients with coronary heart disease after coronary stenting

A. D. Kotvitsky, I. V. Pershukov, S. V. Ostashchenko, T. N. Kuznetsova, A. A. Omarov, J. M. Ramazanov, Z. A. Karben, S. N. Shcherbo, T. A. Batyraliev, B. A. Sidorenko
The Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov, Moscow; the Central State Medical Academy of the Administrative Department of the President of Russia, Moscow; Voronezh Regional Clinical Hospital № 1, Voronezh; Russia; the Scientific and Research Institute of Cardiology and Internal Diseases, Almaty, Kazakhstan; the Central Hospital Of Oil Industry Workers, Baku, Azerbaijan; Medical University SANKO, Gaziantep, Turkey

Препамбула. Пациентов со сниженной инактивацией тромбоцитов ацетилсалициловой кислотой часто называют аспирином-резистентными. Эти пациенты могут

иметь повышенный риск развития сердечно-сосудистых (тромбоэмболических) событий. Следовательно, выявление таких пациентов с помощью измерения функции блокирования агрегации представляет большой интерес. Этот вопрос наиболее важен для пациентов, которым имплантированы коронарные стенты.

Цель данного исследования была оценить и сравнить частоту резистентности по результатам теста ARU VerifyNow двух разных форм АСК: оригинального кишечнорастворимого Аспирина Кардио 100 мг и достаточно известной формы АСК — Кардиомагнила 75 мг. Мы хотели проанализировать это на когорте пациентов со стабильной ИБС, которые незадолго до настоящей оценки перенесли ЧКВ с имплантацией коронарного стента.

Методы. Тромбоцитарная функция 277 пациентов течение первых 30 дней после ЧКВ, ежедневно принимающих АСК, была оценена тестом ARU VerifyNow. Первую группу (А) составили 129 пациентов, которые принимали Аспирин Кардио 100 мг, во вторую группу (К) вошли 148 пациентов, которые принимали Кардиомагил 75 мг. Пациентов считали «резистентными», если по результатам теста ARU VerifyNow определение единиц реактивности на аспирин составило более 550 (ARU > 550).

Результаты. Распространенность АСК-резистентности (ARU > 550) в группе А, где использовался оригинальный кишечнорастворимый аспирин, составила 0,8% (1/129), в то время как в группе К она оказалась 18,9% (28/148). По результатам Z-теста (z-критерий Фишера) и критерию Хи-квадрат межгрупповые различия в частоте оказались значимыми (P < 0,05).

Выводы. Значительное количество (более 18%) пациентов с ИБС обнаружили резистентность к АСК при использовании Кардиомагнила 75 мг в сутки, в то время как при применении оригинального кишечнорастворимого аспирина 100 мг в сутки резистентность наблюдалась крайне редко (менее чем в 1%). Для оригинального кишечнорастворимого аспирина резистентность встречается исключительно редко (менее 1%), поэтому эта форма АСК, эффективно подавляя агрегацию тромбоцитов, значительно чаще достигает терапевтического эффекта, что снижает риск ишемических осложнений у больных после коронарного стентирования.

Роль остаточной реактивности тромбоцитов в развитии кровотечений после коронарного стентирования

А. Д. Котвицкий¹, И. В. Першуков², С. В. Осташенко³, Т. Н. Кузнецова³, А. А. Омаров⁴, Джафар Мамед-оглы Рамазанов⁵, З. А. Карбен⁶, С. Н. Щербо¹, Т. А. Батыралиев⁶, Б. А. Сидоренко²

¹ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва; ²ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента России, г. Москва; ³БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1», г. Воронеж; ⁴РГП «Научно-исследовательский институт кардиологии и внутренних болезней» Минздрава Казахстана, Алматы, Казахстан; ⁵Центральная больница нефтяников Минздрава Азербайджана, Баку, Азербайджан; ⁶Медицинский университет САНКО, Газиантеп, Турция

Role of residual reactivity of platelets in development of bleeding after coronary stenting

A. D. Kotvitsky, I. V. Pershukov, S. V. Ostashchenko, T. N. Kuznetsova, A. A. Omarov, J. M. Ramazanov, Z. A. Karben, S. N. Shcherbo, T. A. Batyrallyev, B. A. Sidorenko

The Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov, Moscow; the Central State Medical Academy of the Administrative Department of the President of Russia, Moscow; Voronezh Regional Clinical Hospital № 1, Voronezh; Russia; the Scientific and Research Institute of Cardiology and Internal Diseases, Almaty, Kazakhstan; the Central Hospital Of Oil Industry Workers, Baku, Azerbaijan; Medical University SANKO, Gaziantep, Turkey

Препамбула. Потребность в прогнозе будущих кровотечений после чрескожных вмешательств и имплантацией коронарных стентов остается высокой, но практических механизмов в настоящее время для этого не предложено.

Цель. Мы решили выявить остаточную реактивность тромбоцитов (ОРТ) у пациентов, которые до одного года наблюдения после ЧКВ с имплантацией одного или нескольких коронарных стентов оказались повторно госпитализированы из-за развития выраженного кровотечения. В этой когорте больных мы хотели найти границу низкой реактивности тромбоцитов по результатам прикроватного теста VerifyNow, чтобы использовать эту величину для прогноза кровотечений.

Материал и методы. В трех центрах в течение 2011–2014 годов были последовательно пролечены больные с различными формами острого коронарного синдрома (ИМ с подъемом и без подъема сегмента ST, нестабильная стенокардия). Из этой группы мы включили в первичное наблюдение 1 127 больных, которые получили ЧКВ с имплантацией стента, выделяющего лекарство, без предшествующего тромболизиса (при ИМпST), без сопутствующей терапии Iib/IIIa-блокаторами во время ЧКВ и были выписаны из стационара без госпитальных ишемических / геморрагических осложнений на фоне двойной антитромботической терапии (ДАТТ) с рекомендацией строгого соблюдения терапии до одного года. Все пациенты получали аспирин в дозе 75–100 мг в сутки. Из блокаторов рецепторов P2Y₁₂ 936 пациентов (83 %) при выписке получали клопидогрел в дозе 75 мг в сутки, а 191 пациент (17 %) получал тикагрелор в дозе 180 мг в сутки, разделенной на два приема.

Результаты. За время наблюдения до одного года с выраженными кровотечениями после ЧКВ были повторно госпитализированы 28 больных (2,5 %). Из этих 28 больных 11 пациентов принимали АСК и клопидогрел (39 %) и 17 пациентов принимали АСК и тикагрелор (61 %). У всех больных при поступлении была определена прикроватная функция тромбоцитов PRU VerifyNow. Оказалось, что величина PRU в этих 28 случаях составила от 4 до 127.

Выводы. Ранние исследования (где, однако, не изучался тикагрелор) указывали, что риск кровотечений у пациентов на ДАТТ возрастал при PRU менее 85, однако настоящее исследование показало, что кровотечения случаются при больших значениях остаточной реактивности тромбоцитов. Таким образом, граница низкой реактивности тромбоцитов остается не вполне определенной, по нашим данным, она находится у PRU = 127. Мы считаем, что требуется переоценка риска кровотечений после ЧКВ и его отдельное изучение для каждого из используемых антитромботических агентов (клопидогрел, тикагрелор и др.), поскольку частота кровотечений между двумя представленными агентами различается более чем в 1,5 раза (17/11).

Медикаментозная терапия кровотечений и тромбозов: новые достижения и новые проблемы

Е. В. Ройтман

Национальная ассоциация по тромбозу и гемостазу; ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

Medical therapy of bleeding and thrombosis: new developments and new challenges

E. V. Roitman

National Association for Thrombosis and Hemostasis; the Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov; Moscow, Russia

Спектр медикаментозных средств гемостаза включает в себя препараты факторов свертывания крови, мембраностабилизаторов, ингибиторов сериновых протеаз и антифибринолитических агентов, а также гормональные средства и препараты крови. При кровотечениях, не связанных с различными формами гемофилии, препараты факторов свертывания крови, в частности эптактог-альфа (гVIIa), продолжают использоваться формально off-label. Среди новшеств использования гVIIa следует отметить подтвержденную возможность ингаляционного применения препарата, а также многочисленные доказательства успешного применения его сниженных (по сравнению с обычными) доз с не меньшей эффективностью и большей безопасностью. В дискуссии о возможности использования гVIIa при кровотечениях на фоне препаратов-ингибиторов фактора Ха мнение начало склоняться в сторону положительного ответа. В свою очередь, целесообразность применения гVIIa в профилактических целях считается сомнительной. В отношении препаратов антифибринолитического действия, в частности, препаратов транексамовой кислоты (ТК), несомненный интерес представляют возможности внутрисуставного введения препаратов ТК (например, при гемартрозах на фоне терапии оральными антикоагулянтами). Следует обратить внимание на усиливающуюся тенденцию к их местному применению в противовес системному: при том же адекватном клиническом результате при этом достигается значимый экономический эффект, тогда как низкодозная терапия этими препаратами, напротив, не позволяет обеспечить ни надежный гемостаз, ни экономию средств. В свою очередь, высокодозная терапия препаратами ТК, обеспечивая гемостаз, неожиданно может стать причиной развития судорожных припадков. В оценке целесообразности назначения препаратов вазопрессина, его синтетических аналогов и соматостатина для достижения гемостаза все больше обращают внимание на их побочные, прежде всего, гемодинамические эффекты. С этой точки зрения, мнение о выборе стало смещаться в пользу препаратов соматостатина в целом и, в частности, в пользу возможности применения их высоких доз (например, для остановки кровотечения и [или] профилактики повторных кровотечений из варикозно расширенных вен пищевода). Применение препаратов крови все более приходит в соответствие с принципами концепции Patient Blood Management, чему несомненно способствуют разработки и внедрение алгоритмов для определения оптимального выбора, комбинации и объемов трансфузии этих средств. Вместе с тем все чаще звучат нарекания к докумен-

там, в том числе к российским, которые регламентируют параметры качества препаратов крови (в частности, тромбocитного концентрата), но при этом никак не отражают их гемостатическую активность. Низкомолекулярные гепарины (НМГ) остаются «золотым стандартом» противотромботической терапии и профилактики. Выбор НМГ определяется в первую очередь целью их назначения: профилактическая или лечебная (лечебно-профилактическая). В первом случае целью становится приоритетное ингибирование активности фактора Ха, и выбор должен быть сделан в пользу НМГ с высоким соотношением анти-Ха / анти-Па-активности. Ситуации, в которых назначение НМГ преследует лечебную (лечебно-профилактическую) цель, обусловлены особенностями поведения системы свертывания крови на фоне конкретного состояния и (или) заболевания. При подобных состояниях крайне существенную роль играет образование тромбина — не только одно из главных событий в гемокоагуляции (формирование фибрина и активирование тромбоцитов), но и непосредственно влияющее на другие биологические процессы. Поэтому здесь предпочтительным выбором являются НМГ, сохраняющие антитромбиновую активность (анти-Па-активность) за счет содержания в них большего количества фракций верхнего диапазона по молекулярной массе, и при этом проявляющие антагонизм в отношении фактора Ха (анти-Ха-активность). Независимо от соотношения анти-Ха / анти-Па-активности конкретного НМГ, общим требованием является индивидуальное дозирование, а именно подбор дозы и обеспечение стабильности эффекта НМГ. Первое достигается за счет определения активности фактора Ха, второе на основании тромбозластографической оценки паттерна гемокоагуляции. При этом указанные лабораторные методы не взаимозаменяемы и диагностически недостаточны друг без друга. Последнее определяет внимание к выбору лабораторных методов тестирования состояния системы гемостаза, оптимальные из которых позволяют получать результат из так называемых сложных проб (иктеричных, липидемичных, гемолизированных), поскольку сочетают в себе механический и оптический методы детекции. Обязательный лабораторный контроль обеспечивает оптимальный эффект и главным образом безопасность применения любых средств, влияющих на систему свертывания крови. В первую очередь, это относится к прямым оральным антикоагулянтам (прямым ингибиторам тромбина или фактора Ха) и средствам, угнетающим тромбоцитарную агрегацию. Обязательное лабораторное сопровождение является ныне необходимым условием для таргетного выбора препаратов-антиагрегантов. Оценка агрегации и адгезии тромбоцитов в ответ на стимуляцию различными индукторами однозначно должна присутствовать в рутинной практике для исключения резистентности к аспирину и клопидогрелю, выбора более безопасной терапии и подбора адекватных, то есть индивидуальных доз антиагрегантных препаратов. Таким образом, терапия кровотечений и тромбозов была и остается комплексной задачей, требующей умелого сочетания лабораторных и фармакологических средств как друг с другом, так и между собой. При этом новые достижения гемостатической терапии ставят и новые вопросы, решение которых очевидно является безотлагательным.

Влияние гемореологических аспектов при формировании состояния тромботической готовности на фоне некоторых онкогематологических заболеваний

Е. В. Ройтман¹, И. М. Колесникова^{1,2}, И. Л. Давыдкин³, Н. С. Козлова³, М. А. Марков⁴

¹ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва; ²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, г. Москва; ³ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара; ⁴ФФМ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», г. Москва

Influence of hemorheological aspects in formation of thrombotic state of readiness in background of some oncohematological diseases

E. V. Roitman, I. M. Kolesnikova, I. L. Davydkin, N. S. Kozlova, M. A. Markov

The Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov, Moscow; the Federal Research and Clinical Centre for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. Dmitry Rogachyov, Moscow; Samara State Medical University, Samara; the Moscow State University n.a. M. V. Lomonosov, Moscow; Russia

Введение. Пациенты онкологического профиля относятся к группе высокого риска развития венозных тромбозомболических осложнений (ВТЭО). При этом состояние тромботической готовности может формироваться не только нарушениями в системе гемокоагуляции, но и специфическими гемореологическими изменениями.

Цель. Изучить реологические особенности крови и их вклад в формирование состояния тромботической готовности у пациентов с некоторыми онкогематологическими заболеваниями.

Материалы и методы. Мы обследовали 26 взрослых пациентов с истинной полицитемией (ИП) и 48 детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Группу сравнения составили 67 здоровых доноров. Критерием исключения из исследования было наличие почечной недостаточности. Во всех образцах крови определяли гематокрит, количество эритроцитов, эритроцитарные индексы (MPV, MCH, MCHC), количество лейкоцитов, концентрацию фибриногена, а также концентрацию мозгового натрийуретического пептида В-типа (BNP). Все реологические исследования были проведены с соответствии с Ярославским соглашением (2000). Регистрацию вязкости крови проводили в диапазоне скоростей сдвига от 5 до 300 с⁻¹ на ротационном вискозиметре АКР-2 (Россия). Особенностью анализа была запись вискозиметрической кривой сначала при последовательном снижении (от 300 до 5 с⁻¹), а затем при последовательном увеличении скоростей сдвига (от 5 до 300 с⁻¹), не извлекая образец из прибора. Все полученные значения кажущейся вязкости крови пересчитывались на величину гематокрита 40 %. Гемореологический анализ также включал расчет индекса агрегации эритроцитов (ИАЭ) и индекса деформируемости эритроцитов (ИДЭ). Данные были представлены в виде медианы с 95 % ДИ. Различия между группами оценивали с помощью критерия Манна-Уитни (различия достоверны при $p < 0,05$). Для выявления факторов, влияющих на формирование вязкости крови, использовался метод множественного регрессионного анализа.

Результаты. ВТЭО наблюдались у 40 % пациентов с ОЛЛ и у 38 % пациентов с ИП. Повышение концентрации BNP было отмечено у 18 % пациентов без признаков почечной недостаточности, что позволяет предположить наличие субклинической бессимптомной кардиальной дисфункции, которая также является фактором риска развития ВТЭО. Вязкость крови у пациентов с ОЛЛ была ниже, чем у группы сравнения, а у пациентов с ИН достоверно выше. Подобная динамика была характерна и для ИАИ, и ИДЭ. Во всем диапазоне измерения у пациентов с ИП и ОЛЛ значения вязкости крови, полученные при увеличении скорости сдвига, были достоверно ниже, чем значения вязкости крови, полученные при увеличении скорости сдвига. В группе сравнения подобное было отмечено только при низких и средних скоростях сдвига. Агрегационно-деагрегационная способность эритроцитов у пациентов с ИП и ОЛЛ определялась количеством эритроцитов, концентрацией фибриногена, а также количеством лейкоцитов и эритроцитарными индексами (МСН, МСV). При этом у пациентов с ИП вязкость крови на высоких скоростях сдвига зависела от комплексного параметра, который включал в себя количество эритроцитов и количество лейкоцитов. По-видимому, у пациентов с ОЛЛ деагрегация эритроцитов является преобладающей тенденцией в процессе обратимого структурирования крови, а разрушение эритроцитарных агрегатов происходит почти до единичных клеток. У пациентов с ИП деагрегация эритроцитов затруднена, даже при высоких скоростях сдвига остаются гидродинамически-устойчивые эритроцитарные (эритроцитарно-лейкоцитарные) агрегаты.

Выводы. Появление разницы в значениях вязкости крови при снижении и при последующем увеличении сдвиговой нагрузки свидетельствует о нарушении процессов обратимого структурирования крови у пациентов с ОЛЛ или ИП. Таким образом, вклад в состояние тромботической готовности у пациентов онкогематологического профиля вносят гемореологические факторы. Возможно, добавление в терапию гемореологических корректоров позволит повысить эффективность антитромботической профилактики у подобных пациентов.

Глобальные тесты гемостаза в оценке эффективности антикоагулянтной терапии у беременных с острым нарушением мозгового кровообращения

М. И. Сидоркина, К. Н. Ахведиани, Л. С. Логутова, А. А. Травкина, Т. А. Вуймо, Т. С. Будыкина

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России; г. Москва

Global hemostasis tests in efficiency assessment of anticoagulant therapy among pregnant women with acute cerebrovascular accident

M. I. Sidorkina, K. N. Akhvediani, L. S. Logutova, A. A. Travkina, T. A. Vuyimo, T. S. Budykina

The Federal Research and Clinical Centre for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. Dmitry Rogachev; the Moscow Region Scientific and Research Institute for Obstetrics and Gynecology; Moscow, Russia

В последние годы растет внимание к изучению роли генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском тромбофилии, как для развития акушерских осложнений, так и острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК). В общей популяции генетические формы тромбофилии встречаются у 15–20 % населения, а при тромбозах частота тромбофилий достигает 45 %. При ряде тромбогенных мутаций риск церебральных тромбозов повышается более чем в 100 раз, особенно при наличии мультигенных форм. Для профилактики повторных тромбоэмболических осложнений у беременных с ОНМК в анамнезе показано назначение антикоагулянтной терапии с использованием как нефракционированного (НФГ), так и низкомолекулярного гепаринов (НМГ), применение которых требует тщательного мониторинга.

Цель. Выявление частоты генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском тромбофилии у беременных, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения и определение информативности глобальных тестов гемостаза — тромбодинамики и тромбоэластометрии для контроля профилактической антикоагулянтной терапии.

Материалы и методы. Под нашим наблюдением находились 86 беременных с цереброваскулярными заболеваниями: 45 беременных, перенесших ОНМК по ишемическому типу (ИИ), и 41 пациентка с геморрагическим инсультом (ГИ). 13 (28,6 %) беременных с ИИ и семь (17 %) с ГИ перенесли ОНМК во время настоящей беременности. Все пациентки находились на профилактической антикоагулянтной терапии НФГ и НМГ. Беременным проведена оценка состояния системы гемостаза, включая АЧТВ, ПВ, антитромбин III, фибриноген, тромбоэластометрия и тромбодинамика (ТД). Контроль гемостаза осуществлялся в динамике до назначения антикоагулянтов и в точке перед очередным введением препарата. Все беременные были обследованы на наличие генетических мутаций и полиморфизмов, ассоциированных с риском тромбофилии (мутаций FV [Leiden], протромбина, полиморфизмов генов МТГФР и PAI-1). В зависимости от наличия генетических полиморфизмов беременные были разделены на две группы: в I группу вошли 29 пациенток с сочетанными формами тромбофилии, во II группу 57 беременных без тромбофилии.

Результаты. По результатам проведенного скрининга было установлено, что частота генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском тромбофилии у беременных с ИИ, составила 35 %, с ГИ — 32 %. Важно отметить, что у всех пациенток с цереброваскулярным тромбозом (ЦВТ) выявлена тромбофилия высокого тромбогенного риска, также стоит обратить внимание, что при спонтанном кровоизлиянии головного мозга частота тромбофилии составила 75 %, что подтверждает тот факт, что данное состояние является одним из возможных причин развития ОНМК. При исследовании системы гемостаза у всех беременных с тромбофилией была диагностирована гиперкоагуляция (высокий уровень фибриногена и низкий антитромбин III, укорочение АЧТВ, увеличение Ма тромбоэластограммы). Динамические показатели теста ТД — начальная и стационарная (Vst) скорости роста сгустка, а также размер сгустка на 30-й минуте иссле-

дования до терапии также регистрировали гиперкоагуляцию — значения Vst составили $42,4 \pm 11,2$ мкм/мин., в группе без тромбофилии — $36,6 \pm 12,2$ мкм/мин. (норма для беременных 23–37 мкм/мин.). У большей части пациенток с тромбофилиями — 56,7%, по данным ТД, присутствовали очаги патологического спонтанного тромбообразования. Совокупность гиперкоагуляции и очагов спонтанного тромбообразования свидетельствует о риске развития тромботических осложнений, который достоверно выше в группе с тромбофилиями. При динамическом наблюдении пациенток в точке перед очередным введением препарата в профилактической дозе регистрируется статистически значимое снижение значений скоростей роста сгустка как для пациенток с тромбофилиями — Vst равна $29,2 \pm 7,8$ ($p < 0,05$), так и без тромбофилии — $31,1 \pm 3,4$ ($p < 0,05$). Таким образом, стационарная скорость в обеих группах укладывалась в референсный диапазон для беременных. Также на фоне лечения отмечено статистически достоверное снижение образования спонтанных сгустков в исследуемых группах. Стандартные тесты гемостаза и показатели тромбоэластометрии достоверно не изменялись на фоне гепаринотерапии. По нашим данным, применение антикоагулянтов в профилактических дозах не привело ни к кровотечению, ни к каким либо тромботическим осложнениям в родах и раннем послеродовом периоде, в том числе у пациенток с ОНМК во время беременности.

Выводы. 1) Частота встречаемости генетических полиморфизмов, ассоциированных с риском тромбофилии у беременных, перенесших ОНМК, выше, чем в общей популяции. 2) Выраженность гиперкоагуляции, по данным ТД у беременных с наличием генетической тромбофилии, больше, чем при ее отсутствии. 3) Метод ТД наиболее чувствителен ко всему диапазону изменений гемостаза и может использоваться для мониторинга антикоагулянтной терапии у беременных с ОНМК даже при использовании профилактических доз антикоагулянтов.

IX. Клиническая лабораторная диагностика в акушерстве и гинекологии

Роль дисбаланса сосудистых (ангиогенных) факторов роста в патофизиологии преэклампсии и плацентарной недостаточности

Л. С. Джохадзе, О. В. Макаров, Ю. Э. Доброхотова

Кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

Role of imbalance of vascular (angiogenic) growth factors in pathophysiology of pre-eclampsia and placental insufficiency

L. S. Dzokhadze, O. V. Makarov, E. Yu. Dobrokhotova
The Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov, Moscow, Russia

Под термином «ишемическая болезнь плаценты» все чаще подразумевают преэклампсию (ПЭ) и плацентарную недостаточность, так как во многом патофизиология этих состояний схожа. Преэклампсия всегда подразумевает наличие плацентарной недостаточности той или иной степени выраженности, в то время как далеко не у всех беременных с плацентарной недостаточностью и формированием синдрома задержки роста плода (СЗРП) развивается симптомокомплекс, характерный для ПЭ. Преэклампсия — это состояние с формированием полиорганной недостаточности, с развитием «материнского» синдрома, с обязательным наличием артериальной гипертензии, в то время как при «чистой» плацентарной недостаточности мы наблюдаем изолированное нарушение функции в системе «мать — плацента — плод» без формирования генерализованного эндотелиоза и развития системных нарушений.

Цель. Изучить особенности изменения уровня про- и анти-ангиогенных факторов роста при преэклампсии и синдроме задержки роста плода.

Материалы и методы. В исследование включены 254 беременных: I основную группу составили 116 пациенток с СЗРП, II группу сравнения — 86 беременных с преэклампсией, III контрольную группу — 52 соматически здоровые беременные с физиологическим течением беременности. Всем беременным, помимо традиционного клинико-лабораторного обследования, проведено исследование уровня про-ангиогенного (PIGF) и антиангиогенных (sFlt-1, sEng) факторов роста в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов фирмы R&D Systems (Великобритания) в точном соответствии с рекомендациями фирмы-производителя в 28–34-е недели гестации.

Результаты. У беременных с ПЭ наблюдается достоверное повышение уровней антиангиогенных факторов роста (sFlt-1 — $37\,058,36 \pm 5\,840,17$ пг/мл, sEng — $69\,940 \pm 810$ пг/мл) и снижение проангиогенного плацентарного фактора роста ($29,92 \pm 5,5$ пг/мл) по сравнению с беременными с СЗРП (sFlt-1 — $19\,438,6 \pm 3\,131,8$ пг/мл, sEng — $17\,483 \pm 5\,865$ пг/мл, PIGF — $146,5 \pm 45$ пг/мл) и здоровыми беременными (sFlt-1 — $3\,299 \pm 544$ пг/мл, sEng — $5\,440 \pm 410$ пг/мл, PIGF — $239,1 \pm 65,9$ пг/мл). В исследуемых сроках гестации у беременных с СЗРП уровень ангиогенного коэффициента K, являющегося отношением sFlt-1/PIGF, составлял $610,4 \pm 26,3$, что достоверно ниже значения коэффициента в группе с ПЭ ($1\,675,4 \pm 491,1$; $p < 0,05$). В то же время в обеих группах значение коэффициента было повышено по сравнению с контролем ($240,2 \pm 7,0$; $p < 0,05$). Диапазон значений коэффициента K $480,51–4\,336,73$ обладает чувствительностью 74%, а специфичностью 100% в отношении диагностики преэклампсии.

Выводы. Плацентарная недостаточность с формированием СЗРП и ПЭ характеризуется увеличением антиангиогенных сосудистых факторов роста на фоне снижения проангиогенного фактора и нарастанием их дисбаланса. Однако преэклампсия характеризуется более выраженным дисбалансом ангиогенных факторов роста с преобладанием антиангиогенной активности, что приводит к фор-

мированию не только «изолированной» плацентарной недостаточности, но и к развитию системных изменений, срыву адаптационных механизмов материнского организма, развитию генерализованного эндотелиоза и полиорганной недостаточности, что угрожает жизни и здоровью не только плода, но и беременной.

Изучение эффективности и безопасности применения препарата диеногест (Визанна) в лечении эндометриоза

**Ю. Э. Доброхотова, И. И. Гришин, И. Ю. Ильина,
Д. М. Ибрагимова, Д. М. Калиматова**

Кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

Study of efficacy and safety of dienogest (Visanne) in treatment of endometriosis

Yu. E. Dobrokhotova, I. I. Grishin, I. Yu. Ilyina, D. M. Ibragimova, D. M. Kalimatov

The Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov, Moscow, Russia

В последние годы наблюдается неуклонное увеличение доли генитального эндометриоза в структуре гинекологической заболеваемости. Выполнена оценка эффективности и безопасности применения препарата диеногест (Визанна) в комплексном лечении диагностированного эндометриоза. Проводили комплексное клинико-лабораторное обследование и лечение 53 пациенток, которым была выполнена оперативная лапароскопия, включающая, в зависимости от вида заболевания: удаление эндометриоидных кист яичников 45 (85 %) больным; очагов эндометриоза на брюшине малого таза — восьми (15 %); крестцово-маточных связок — 12 (23 %) и других локализаций — пяти (9,4 %) пациенткам. Пациентки, включенные в исследование, были подразделены на две группы: основную группу составили 33 пациентки, которым после оперативного лечения назначалась терапия диеногестом в дозе 2 мг в течение шести месяцев. В группу сравнения были включены 20 пациенток, которым в послеоперационном периоде не назначалась гормонотерапия. После проведенного лечения у большинства пациенток отмечено снижение выраженности болевого синдрома, более выраженное у пациенток основной группы. Было установлено снижение частоты и выраженности метроррагий и диспареунии. Анализ результатов клинического обследования, инструментальных данных не выявил каких-либо патологических признаков (кроме основного заболевания) в течение всего исследования. Не было отмечено нежелательных явлений. Оценка данных лабораторных тестов, выполненных в ходе исследования, показала отсутствие сдвигов за пределы референсных значений, как показателей общего и биохимического анализа крови (концентраций холестерина, липидов, глюкозы, билирубина, мочевины, активности трансаминаз) и коагулограммы (международного нормализованного отношения, активированного частичного тромбопластинного времени, уровня фибриногена и антитромбина III). Комбинированное лечение эндометриоза позволяет улучшить результат лечения. Выявленные изменения

свидетельствовали о снижении профиля тяжести симптомов эндометриоза, являющихся основной причиной нарушения качества жизни у женщин с эндометриозом. Применение диеногеста в течение шести месяцев показало его метаболическую нейтральность и безопасность применения. Таким образом, лекарственное средство Визанна (диеногест 2 мг) является высокоэффективным в комплексном лечении больных с диагностированным эндометриозом. Применение данного препарата приводит к снижению выраженности болевых ощущений и метроррагий. Препарат является безопасным и характеризуется низким уровнем побочных эффектов.

Скрининг показателей тиреоидного статуса в комплексном обследовании беременных с угрозой невынашивания

Ю. Э. Доброхотова, И. В. Бахарева

Кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

Screening of indicators of thyroid status in complex examination of pregnant women with threat of miscarriage

Yu. E. Dobrokhotova, I. V. Bakhareva

The Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov, Moscow, Russia

Нарушения функции щитовидной железы (как повышение, так и снижение) оказывают существенное влияние на развитие беременности, формирование и развитие органов и систем плода, повышают риск невынашивания беременности, мертворождения, задержки роста плода, врожденных пороков развития.

Цель исследования. Оценка распространенности тиреоидной патологии и ее влияния на течение беременности при угрозе невынашивания в I–III триместрах беременности.

Материалы и методы. Было проведено комплексное клиническое и лабораторное обследование 297 беременных: 228 беременных с угрозой прерывания беременности различных сроков (90 — I триместр, 68 — II триместр, 70 — III триместр) и 69 беременных контрольной группы с нормально протекающей беременностью (30 — I триместр, 20 — II триместр, 19 — III триместр). Проведены исследования в сыворотке венозной крови: хорионического гонадотропина (ХГ), тиреотропного гормона (ТТГ), свободного тироксина (FT4), уровня антител к тиреоидной пероксидазе (АТ-ТПО); оценены их взаимоотношения и влияние на течение беременности. Всем беременным проводили йодопрофилактику 150–250 мкг йода в сутки.

Результаты. Диапазон индивидуальных значений ТТГ в группе с угрозой невынашивания составил 0,02–5,92 мМЕ/л, тогда как в контрольной группе — 0,28–3,49 мМЕ/л, при этом уровень ТТГ более 2,5 мМЕ/л был выявлен в I триместре у 4,4 % беременных с угрозой прерывания и у 3,3 % беременных контрольной группы, во II триместре уровень ТТГ более 3,0 мМЕ/л — у 5,9 % беременных основной группы (в контрольной — не выявлен), в III триместре уровень ТТГ более 3,0 мМЕ/л — у 12,9 % и 5,3 % соответственно. Уровень ТТГ сыворотки

статистически достоверно ниже в I триместре ($p < 0,05$), что совпадает с пиком значений ХГ (коэффициент корреляции $r = -0,37$; $p < 0,05$). В I триместре высокие значения ХГ способствуют стимулированию тиреоидной функции благодаря наличию у ХГ ТТГ-подобной активности. Высокий уровень ТТГ во II и III триместрах коррелировал с такими осложнениями беременности, как преждевременные роды, преэклампсия, плацентарная недостаточность, синдром задержки роста плода. Уровень свободного Т4 по мере прогрессирования гестации постепенно снижался, оставаясь в пределах нормальных значений. В основной группе было выявлено 2 случая изолированной гипотироксинемии в I триместре (при нормальных значениях ТТГ), что потребовало гормонотерапии. Частота выявления антител к тиреоидной пероксидазе (АТ-ТПО) > 50 МЕд/л составила в группе с угрозой невынашивания 11,4%, тогда как в контрольной группе — 4,3% ($p < 0,05$), что подтверждает этиологическую роль аутоиммунных нарушений в невынашивании беременности.

Выводы. Для своевременной диагностики и лечения тиреоидной патологии необходимо скрининговое обследование: определение ТТГ и свободного Т4 на этапе предгравидарной подготовки или в I триместре беременности, при выявлении отклонений — определение антител к тиреоидной пероксидазе (АТ-ТПО), что также позволяет выявить группы риска по невынашиванию беременности. 1) Скрининг функции щитовидной железы позволяет выявить бессимптомные, но клинически значимые нарушения функции ЩЖ с целью предотвращения ассоциированных осложнений гестации и патологии плода. 2) Бессимптомная гестационная гипотироксинемия в I триместре подлежит неотложной гормональной коррекции. 3) Большинство случаев гестационной гипертироксинемии не является патологией и носит обратимый характер, не требует терапии и не является абсолютным показанием к отмене йодной профилактики (для обеспечения потребности плода в йоде во II, III триместрах беременности). 4) Для йодопрофилактики беременным, особенно в первом триместре, необходим прием препаратов йода в комбинации с его синергистами и другими микронутриентами, такими как селен, цинк, железо, витамин А и витамины группы В (в составе витаминно-минеральных комплексов).

Ранняя диагностика доклинических форм генитального пролапса у женщин репродуктивного возраста

С. В. Камоева, О. В. Макаров, Х. А. Абеева, Ю. Э. Доброхотова

Кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

Early diagnostic starting prolapse of genitalia under absence of clinical signs of disease in women of reproductive age

S. V. Kamoeva, O. V. Makarov, Kh. A. Abaeva, Yu. E. Dobrokhotova
The Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov, Moscow, Russia

Генитальный пролапс (ГП) занимает третье место в структуре гинекологической патологии, требующей хирургического лечения. Для изучения патогенеза ГП

важно определение начальных признаков разрушения соединительной ткани (СТ) — разрушение эластического волокна как тканевого маркера начальных доклинических признаков развивающегося ГП, приводящее к ослаблению эластичности и растяжимости СТ тазового дна. Целостность и функциональность тазового дна сохраняется и обеспечивается посредством сложных процессов взаимодействия между мышцами и соединительной тканью мочеиспускательного канала, прямой кишки и влагалища. Установлено, что ответственны за эти процессы матриксные белки LOXL-1 (лизилоксидазаподобный белок-1) и FBLN5 (фибулин-5), принимающие непосредственное и ведущее участие в формировании и объединении эластического волокна.

Целью нашего исследования явилась ранняя диагностика начальных доклинических форм ГП у пациенток репродуктивного возраста.

Пациенты и методы исследования. Проведен сравнительный анализ содержания белков LOXL-1 и FBLN5 у 28 женщин репродуктивного возраста без ГП (контрольная группа) и у 30 женщин с ГП I–II степеней (POPQ) (основная группа) без клинических проявлений. Исследовали биопсийный материал передней и задней стенок влагалища, взятых в ходе различных малых гинекологических операций при заполнении добровольного информированного согласия на участие в исследовании. Иммуногистохимические исследования были проведены в Первом МГМУ имени И. М. Сеченова на кафедре патологической анатомии им. И. М. Струкова (зав. кафедрой академик РАЕН, профессор В. С. Пауков). Результаты иммуногистохимической (ИГХ) реакции для исследуемых антител оценивались полуколичественным методом в баллах по количеству позитивно окрашенных клеток, причем отдельно оценивались эпителиальные клетки, фибробласты, эндотелий сосудов и строма, если продукт реакции выявлялся в указанных выше структурах. Оценку интенсивности реакции проводили по шести балльной системе: два балла — до 20% окрашенных клеток; четыре балла — от 20 до 40% окрашенных клеток; шесть баллов — более 40% окрашенных клеток

Результаты исследования и обсуждение. Средний возраст пациенток в группах значимо не отличался и составил $38 \pm 6,8$ года. Жалоб пациентки не предъявляли. Наследственность по наличию ГП была отягощена у пяти (17%) женщин основной группы, чего не наблюдали у пациенток группы контроля. Все пациентки в исследуемой группе отмечали наличие в анамнезе беременностей, среднее количество которых в основной группе составило $3,6 \pm 1,6$; в контрольной группе $2,6 \pm 1,9$ ($p = 0,034$). Медицинские абортс составили в основной группе $2,0 \pm 1,5$; в контрольной группе $1,0 \pm 1,3$ ($p = 0,022$). При исследовании эластического компонента в группе с ГП отмечали умеренное содержание эластических волокон, однако большинство из них были фрагментированы. В наших исследованиях FBLN5 выявляли в виде коричневого окрашивания цитоплазмы фибробластов, эндотелия сосудов, в экстрацеллюлярном матриксе (ЕСМ) и в эпителиальных клетках многослойного плоского эпителия. В группе женщин с ГП окрашивание FBLN5 менее интенсивное,

чем в группе контроля ($p < 0,001$). У пациенток без ГП мы наблюдали одинаково высокую экспрессию FBLN5 (5,4 балла) во всех элементах СТ вагинальной стенки: эпителии, эндотелии, фибробластах, экстрацеллюлярном матриксе (ECM); в группе с ГП снижение экспрессии FBLN5 отмечали во всех элементах, однако наиболее значимое снижение FBLN5 отмечено в ECM (2,5 балла); $p < 0,05$. Максимальная экспрессия LOXL-1 достигала не более 4,7 балла (из шести возможных) в эндотелии сосудов СТ вагинальной стенки здоровых женщин репродуктивного возраста.

Таким образом, у пациенток с доклиническими признаками ГП в репродуктивном возрасте мы наблюдали достоверное нарушение эластогенеза (эластинопатия), которое характеризовалось изменением эластического каркаса стенки влагалища. Выявлено снижение как количества эластического волокна, так и нарушение его структуры, что проявлялось его фрагментацией. Определено снижение экспрессии матриксных белков FBLN5 и LOXL-1, необходимых для синтеза и объединения эластических волокон, что может свидетельствовать о начальных доклинических признаках ГП у женщин репродуктивного возраста.

Особенности генов тромбофилии у пациенток с гиперпластическими процессами эндометрия

Л. А. Озолина¹, И. А. Лапина¹, Л. И. Патрушев², Т. Ф. Коваленко²

¹Кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, лаборатория биотехнологии учреждения Российской академии наук «Институт биоорганической химии имени акад. М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова»; г. Москва

Features of genes of thrombophilia in patients with hyperplastic processes of endometrium

L.A. Ozolina, I.A. Lapina, L.I. Patrushev, T.F. Kovalenko
The Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov; the Institute of Bioorganic Chemistry n.a. acad. M.M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov; Moscow, Russia

Врожденная тромбофилия имеет место при наличии генетических дефектов в системе свертывания крови и фибринолиза. Скрининг таких дефектов помогает на раннем этапе выявить группу риска по развитию тромбозов и тромбоземболий на фоне гормональной терапии и внести соответствующие коррективы в тактику ведения пациенток.

Целью нашего исследования явилось выявление частоты встречаемости полиморфизмов, предрасполагающих к тромбофилии у больных гиперплазией эндометрия в сравнении с пациентками, имевшими в анамнезе венозные тромбозы, и пациентками контрольной группы для оптимизации лечения женщин и профилактики венозных тромбов и тромбоземболий.

Материалы и методы. Проанализированы результаты комплексного клиничко-лабораторного обследования 207 пациенток, которые были разделены на три группы. Основную группу составили 95 пациенток. Критериями включения в данную группу явились: морфологически

подтвержденный диагноз ГПЭ с нарушением жирового обмена (50 пациенток) и без него (45 пациенток). В группу сравнения были включены 51 пациентка с венозными тромбозами и посттромботической болезнью. Для контрольной группы мы выбрали 61 женщину без ожирения, не имеющую в анамнезе ГПЭ. Всем пациенткам было проведено полное клиничко-лабораторное обследование. Генотипирование осуществляли с целью выявления полиморфизмов в системе генов: F5 (мутация FV Leiden, ген кодирует фактор V); F2 (G20210A, протромбин); MTHFR (C677T, 5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза), SERPINE1 (4G/5G, ингибитор активатора плазминогена-1), THBS4 (G1186C, тромбоспондин-4), F7 (G10976A, фактор VII), ITGA2 (C807T, гликопротеин GpIa), ITGB3 (T1565C, аллоантиген PI(A2), гликопротеин GpIIb), а также ACE (I/D, ангиотензинконвертирующий фермент) и VKORC1 (1639G>A, эпоксидредуктаза витамина K) Источником ДНК для генотипирования были образцы крови, которые собирали в вакутейнеры, содержащие ЭДТА и хранили при $-80 \dots -20$ °C до выделения ДНК. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью наборов реактивов Diatom DNA Prep 200, основанных на использовании гуанидинтиоционата и Nucleus-сорбента (Isogene Lab, Россия). Выделенную ДНК хранили в морозильной камере при -20 °C. Генотипирование проводили с использованием оригинальных тест-систем, разработанных в Институте биоорганической химии имени акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, основанных на ПЦР в режиме реального времени с аллель-специфическими зондами.

Результаты исследования. Средний возраст обследуемых женщин колебался от $44,85 \pm 7,29$ до $57,02 \pm 8,27$ года. Носительство мутации FV Leiden (ген фактора V) в гетерозиготном состоянии выявлен всего в 4,21 % случаев у пациенток с ГПЭ, то есть не более, чем в контрольной группе. Носительство аллеля A при полиморфизме G20210A гена протромбина (F2) в общей популяции составляет 1–4 %, и в нашем исследовании частота колебалась в диапазоне от 2,27 до 4,21 %. В отношении гена MTHFR (C677T, 5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза) у пациенток с венозными тромбозами частота встречаемости гомозиготного мутантного генотипа T/T была достоверно выше, чем у женщин контрольной группы (13,72 %), а у женщин с ГПЭ данный неблагоприятный генотип не встречается чаще, чем в обычной популяции. У носителей аллеля T при мутации MTHFR риск тромбозов увеличивается в 1,8 раза в популяции и в 2,1 раза при наличии ГПЭ. Для определения риска возникновения тромбозов у пациенток с ГПЭ в зависимости от наличия различных аллелей гена PAI-1 нами было вычислено отношение рисков у носителей различных вариантов гена. По двустороннему точному критерию Фишера риск развития тромбозов у женщин с ГПЭ, носителями аллеля 4G, в 1,56 раза выше, чем при наличии альтернативного аллеля 5G ($OR = 1,56$; $df = 0,90-2,72$). Крайне интересными представляются результаты, полученные у женщин с полиморфизмом G1639A гена VKORC1. Получилось, что с учетом точного двустороннего критерия Фишера, риск развития венозных тромбозов у женщин-носителей аллеля A в 2,22 раза выше, чем при наличии альтернативного аллеля G ($OR = 2,22$; $df = 1,25-3,96$).

Заключение. Генотипирование является важным методом прогнозирования высоких рисков развития венозных тромбозов у пациенток, входящих в группы риска, при назначении им гормональной терапии. Учитывая недостаточность полученных данных, исследование будет продолжено и расширено. Так как нам представляется, что выявление аллель-ассоциированных заболеваний позволит осуществлять лечение пациенток и профилактику рецидивов с истинных этиопатогенетических позиций, когда отправной точкой выбора лечения и профилактики станут индивидуальные особенности генома.

Полиморфизм генов, контролирующих процессы эластогенеза, у женщин с пролапсом тазовых органов

М. Б. Хаджиева^{1,3}, О. В. Макаров, Ю. Э. Доброхотова²,
С. В. Камоева², С. К. Абилов¹, Л. Е. Сальникова¹

¹ФГБУН «Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова» РАН, ²кафедра акушерства и гинекологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, ³ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России; г. Москва

Polymorphism of genes controlling processes of elastogenesis in women with pelvic organ prolapse

M. B. Khadzhieva, O. V. Makarov, Yu. E. Dobrokhotova, S. V. Kamoeva, S. K. Abilev, L. E. Sal'nikova
The Institute for General Genetics n.a. N. I. Vavilov; the Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov; the Federal Research and Clinical Centre for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. Dmitry Rogachyov; Moscow, Russia

Пролапс тазовых органов — распространенное гинекологическое заболевание, характеризующееся опущением и выпадением тазовых органов в результате ослабления связочно-мышечного аппарата. Одним из ключевых компонентов структур тазового дна является эластин, обуславливающий растяжимость и эластичность соединительной ткани; данное свойство крайне важно для реализации детородной функции. В исследованиях на мышцах с нулевыми мутациями по генам, ответственным за эластогенез, показано, что синтез и сборка эластичных волокон имеют решающее значение для восстановления поддержки тазовых органов после вагинальных родов, а нарушение эластогенеза играет основную роль в развитии пролапса тазовых органов. В настоящее время полиморфные варианты генов FBLN3 (fibulin 3) и LOXL1 (lysyl oxidase like 1) в ассоциации с риском развития ПТО практически не изучены.

Целью нашей работы явился поиск полиморфных вариантов генов экстрацеллюлярного матрикса FBLN3 и LOXL1 в ассоциации с развитием ПТО.

Материалы и методы. В настоящем исследовании приняли участие 502 пациентки, проходившие лечение на клинических базах кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета РНИМУ имени Н. И. Пирогова. Основную группу составили 210 женщин с ПТО III–IV стадий по системе POP-Q (Pelvic Organ Prolapse Quantification), контрольную — 292 женщины без данной патологии; средний возраст в группах составил $57,65 \pm 10,80$ и $57,25 \pm 12,70$ года соответственно. Из исследования были исключены паци-

ентки с дифференцированной дисплазией соединительной ткани (синдром Марфана, синдром Элерса-Данлоса, несовершенный остеогенез, синдром вялой кожи), а также с приобретенными нарушениями соединительной ткани (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродермия, полимиозит, дерматомиозит и т.д.). Обе группы были аналогичны по факторам риска (возраст, ИМТ, репродуктивный период или менопауза / постменопауза). Преимуществом данной выборки, несмотря на небольшой объем, является применение подхода «экстремальных» фенотипов, который заключался в отборе в основную группу только пациенток с тяжелыми стадиями пролапса, в то время как контрольную группу представляли женщины без доклинического проявления заболевания. ДНК из цельной крови выделяли с помощью наборов Diatom DNA Prep 200 («Изоген», Россия). Генотипирование выполнялось методом тетра-праймерной аллель-специфической ПЦР (наборы GenPak PCR Core, «Изоген», Россия). В связи с отсутствием для генов FBLN3 и LOXL1 известных функциональных полиморфных вариантов, наше исследование было выполнено с применением подхода, заключающегося в подборе таргетных (tagger) SNPs. С целью выявления ассоциации полиморфных вариантов генов, вовлеченных в эластогенез, с развитием пролапса тазовых органов (ПТО) нами были изучены rs2165241, rs2304719, rs893821 гена LOXL1 и rs3791679, rs1367228, rs3791660, rs2033316 гена FBLN3. Выбор сайтов осуществлялся с применением подхода с подбором таргетных (tag) SNPs. 210 пациенток с ПТО и 292 женщины без данной патологии были прогенотипированы методом тетра-праймерной аллель-специфической ПЦР по вышеперечисленным полиморфным вариантам. Проведенный анализ выявил ассоциацию аллеля rs2304719-T ($P_{\text{adj}} = 0,0025$; OR = 1,87; 95 % ДИ 1,24–2,81; $P_{\text{Bonferroni}} = 0,0071$) и гаплотипа rs2165241(C) — rs2304719(T) — rs893821(T) ($P = 0,029$; OR = 1,47; 95 % ДИ 1,04–2,08) гена LOXL1 с повышенным риском развития ПТО, а также слабую ассоциацию с заболеванием аллеля rs3791660-C и гаплотипа rs3791679(T) — rs1367228(A) — rs3791660(C) — rs2033316(A) гена FBLN3 ($P = 0,044$; OR = 1,55; 95 % ДИ 1,01–2,39 и $P = 0,028$; OR = 1,98; 95 % ДИ 1,08–3,65 соответственно). Одним из основных факторов, провоцирующих развитие опущения тазовых органов, являются роды через естественные родовые пути. В связи с этим мы стратифицировали выборку по количеству родов на две группы: 0–1 роды и 2 родов и более. В группе с неоднократными родами, как и в общей выборке, статистически значимый результат получен для рискового аллеля rs2304719-T гена LOXL1 (множественный регрессионный анализ: доминантная модель, $P_{\text{adj}} = 0,045$; OR = 1,77; 95 % ДИ 1,01–3,09). Гаплотипический анализ в данной группе выявил протективный гаплотип rs2165241(C) — rs2304719(C) — rs893821(T), встречающийся достоверно чаще в группе здоровых женщин ($P = 0,012$; OR = 0,37; 95 % ДИ 0,17–0,80; частота встречаемости 9,8 %).

Выводы. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что вариабельность гена LOXL1 влияет на риск развития пролапса тазовых органов, в том числе и в сочетании с неоднократными родами, в то время как влияние вариабельности гена FBLN3 незначительно. Скрининг

зарегистрированных рискованных аллелей и гаплотипов и поиск новых позволит в дальнейшем разработать подходы для выявления групп риска развития ПТО среди женщин репродуктивного возраста.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 15–04–02378).

Х. Современные лабораторные технологии в перинатологии и педиатрии

Лабораторная служба пренатальной диагностики в России. Комбинированный скрининг хромосомных аномалий и врожденных пороков развития у плода в I триместре беременности

Е. А. Калашникова, С. Н. Кокаровцева, Е. Ю. Воскобоева, А. С. Иванюк, Е. В. Судакова, А. И. Чепурная, С. Ю. Мамлеева

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, г. Москва

Laboratory services for prenatal diagnosis in Russia. Combined screening of fetal chromosomal abnormalities and congenital malformations in first trimester

E. A. Kalashnikova, S. N. Kokarovtseva, E. Yu. Voskoboeva, A. S. Ivanyuk, E. V. Sudakova, A. I. Chepurnaya, S. Yu. Mamleeva
The Moscow Region Scientific and Research Institute for Obstetrics and Gynecology; the Medical and Genetic Scientific Centre, the Russian Medical Academy for Postgraduate Education; Moscow, Russia

В 2010 году в трех первых регионах Российской Федерации (Московской, Ростовской и Томской областях) в рамках национального проекта «Здоровье» стартовала программа «Пренатальная (дородовая) диагностика нарушений развития ребенка» по проведению массового комбинированного пренатального скрининга на хромосомные аномалии (ХА) и врожденные пороки развития (ВПР) у плода в I триместре беременности (от 11 до 14 недель). В основу нового алгоритма раннего пренатального скрининга (РПС) в России положены международный опыт и рекомендации независимой врачебной организации Фонда медицины плода (FMF).

Цель. Оценить результаты и определить направления совершенствования лабораторного обеспечения нового алгоритма комбинированного скрининга в России.

Материалы и методы. Методы раннего пренатального скрининга в сроках 11–14 недель беременности включали: 1. ультразвуковое обследование состояния плода с оценкой анатомических структур и фетометрических параметров — эхо-маркеров ВПР и ХА (толщины воротникового пространства (ТВП), носовой кости (НК), кровотока в венозном протоке и кровотока на трикуспидальном клапане), проводимое на экспертном уровне диагностики врачом, подготовленным по специальной программе и сертифицированным на данный вид деятельности в рамках междуна-

родной сертификации (условие доступа к проведению УЗИ в системе РПС I триместра); 2. исследование материнских сывороточных маркеров ХА (СМ) (ассоциированного с беременностью белка А [PAPP-A] и свободной бета-субъединицы ХГЧ [св. β -ХГЧ]) с использованием доказательно эффективной иммунофлуоресцентной технологии, сертифицированной FMF. Использовались аналитические системы «Дельфия» (AutoDelfia, DelfiaExpress; Perkin Elmer), «Криптор» (Brahms Kryptor, Kryptor Compact plus; Thermo Fisher Scientific); 3. комплексный расчет индивидуального риска ХА (пороговое значение 1/100) по совокупности индивидуальных и анамнестических данных беременной женщины и плода при помощи программного обеспечения, позволяющего проводить внешний аудит ультразвуковых и биохимических измерений (программа Astraia); 4. цитогенетические и молекулярно-(цито)-генетические исследования плодного материала, полученного инвазивными методами (аспирация ворсин хориона, амниоцентез и кордоцентез), для постановки диагноза ХА; 5. медико-генетическое консультирование беременных женщин группы высокого индивидуального риска в медико-генетических консультациях (отделениях, центрах) и пренатальный консилиум по дальнейшей акушерской тактике; 6. учет выявленной патологии, ведение регистров ВПР и ХА, учет исходов беременности.

В 2014 году проведен аудит данных (за 2011–2013 годы), в 2015-м аудит за 2014 год, в 2016-м готовится аудит за 2015 год. Число регионов, включенных в аудит, возросло с трех на старте проекта в 2011 году до 63 в 2015-м. Источником данных являлась унифицированная для всех субъектов программа Astraia. На основе присланных регионами данных проводили расчет ряда показателей в сравнительной динамике до и после 2011 года. Данные до 2011 года взяты из различных публикаций в медицинской печати по данной теме.

Результаты. Введение нового алгоритма РПС заметно увеличило качество комбинированного скрининга: группа высокого риска снизилась с 30 до 1,8% от всех обследованных, эффективность пренатального кариотипирования увеличилась с 6 до 28%, чувствительность скрининга в выявлении синдрома Дауна повысилась с 30 до 81% в среднем по регионам России. Средний охват определения СМ в ходе РПС к 2011–14 годам составил 94,4%, что можно считать удовлетворительным. При анализе результатов определения СМ наблюдалось систематическое завышение МоМ для св. β -ХГЧ и умеренное для PAPP-A на аналитических системах «Дельфия». Медиана совокупности значений региональных медиан МоМ за 2011–2013 годы для св. β -ХГЧ превышала 1,0 на 15,9%, для PAPP-A на 5,6%. Для лабораторий, работающих с системами «Криптор», за 2011–2013 годы наблюдалось заметное превышение медиан МоМ для PAPP-A. Отклонение медианы совокупности значений региональных медиан МоМ от 1,0 для св. β -ХГЧ составило 0,7%, для PAPP-A 13,0%. В соответствии с алгоритмом программы при накоплении более тысячи определений проводилась коррекция медиан СМ, что позволило в дальнейшем адекватно рассчитывать МоМ СМ, и, соответственно, формировать группу риска по ХА. Однако к 2014 году лишь девять регионов провели корректировку значения

медиан СМ. Внешний российский контроль качества определения СМ при РПС проводили в 2011–2014 годах 81–90% лабораторий, а международный всего пять регионов (единственная для СМ зарегистрированная в РФ система внешнего контроля качества «Рикас»). Наиболее сложным этапом лабораторной пренатальной диагностики представляется организация и обеспечение деятельности лабораторий цитогенетической диагностики ХА у плода. Количество регионов, имеющих цитогенетические лаборатории, увеличилось с 90 до 98%, из них число лабораторий, использующих молекулярно-цитогенетические методы (в основном флуоресцентную гибридизацию *in situ*), выросло с 40 до 51%, молекулярно-генетические (различные виды анализа пролимеразной и лигазной цепных реакций, сравнительной геномной гибридизации) — достигло 20%. Снизилась доля кордоцентезов с определением кариотипа лимфоцитов пуповинной крови плода с 48% (до 2011 года) до 7% (2014). Возрастает, хотя и медленно, количество лабораторий, проводящих кариотипирование клеток амниотической жидкости: 21% регионов. К сожалению, высок процент простоя высокотехнологичного оборудования: 23% (основной фактор — нехватка кадров, высокая стоимость реагентов, отсутствие регистрационных удостоверений). Внешний контроль качества по цитогенетике проводят 77% лабораторий, из них 16% не видят смысла в участии в подобных программах.

Выводы. Стандартизация подходов в ультразвуковом и лабораторном обследовании беременных женщин, единое программное обеспечение расчета риска ХА плода с возможностью мониторинга измерения маркеров, перевод обследования в I триместр беременности позволили достичь заметного улучшения качества массового пренатального скрининга ХА и ВПР плода в России. 1) В лабораторном секторе комбинированного скрининга необходимо в полном объеме использовать возможности аудита отклонения медиан СМ для правильного расчета МоМ и значений риска ХА. Для цитогенетической и молекулярно-генетической диагностики ХА крайне необходимо увеличение количества квалифицированных кадров лабораторной генетики. 2) Успешное осуществление программы «Пренатальная (дородовая) диагностика нарушений развития ребенка» возможно лишь в тесном сотрудничестве врачей акушеров-гинекологов, генетиков, специалистов ультразвуковой диагностики, врачей лабораторной диагностики.

Оценка уровня оксида азота и серотонина в сыворотке крови детей с патологией верхнего отдела желудочно-кишечного тракта

К. В. Киреева, А. К. Мартусевич, Э. Н. Федулова

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, г. Нижний Новгород

Estimation of nitric oxide and serotonin level in blood serum of children with pathology of upper part of gastro-intestinal tract

K. V. Kireeva, A. K. Martusevich, E. N. Fedulova

The Privolzhsky Federal Medical Research Centre, Nizhny Novgorod, Russia

За последнее десятилетие структура заболеваемости пищеварительной системы, в том числе у детей, несколько изменилась в сторону превалирования гастроэзофагеаль-

ной рефлюксной болезни (ГЭРБ). В ее патогенезе лежит нарушение моторно-эвакуаторной функции эзофагогастродуоденальной зоны, приводящей к забросам кислого и (или) щелочного содержимого желудка с последующим поражением слизистой оболочки пищевода и развитием специфических для рефлюкс-эзофагита клинических симптомов в виде изжоги, отрыжки, одинофагии. Важная роль в развитии рефлюкс-эзофагита отводится гуморальной системе. Доказано воздействие многих медиаторов, таких как ацетилхолин, соматостатин, энкефалины, секретин, глюкагон и другие. В последние годы особое внимание уделяется оксиду азота. По данным литературы, он оказывает регулирующее влияние на тонус сосудов, гладкой мускулатуры, свертываемости крови, передачи нервного импульса. Имеются работы, подтверждающие гастропро-теktivную роль оксида азота при поврежденной слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Серотонин, входящий в состав гуморальной системы ЖКТ, оказывает возбуждающее влияние на парасимпатический отдел ствола головного мозга, регулирует активность вазомоторных и терморегулирующих центров мозга, а также рвотного центра. В физиологических условиях серотонин принимает участие в регуляции секреторной активности и моторики пищеварительного тракта. Таким образом, спектр влияний биологически активных веществ на ЖКТ чрезвычайно широк и неоднозначен. Следовательно, изучение их роли в регуляции и возможной взаимосвязи при патологии верхних отделов пищеварительного тракта в педиатрической практике представляется актуальной задачей, так как может способствовать уточнению патогенетических механизмов развития ГЭРБ.

Цель. Выявить особенности регуляции оксида азота и серотонина у детей с патологией верхнего отдела ЖКТ (ВОПТ).

Материалы и методы. Проведено проспективное открытое нерандомизированное контролируемое исследование, в котором приняли участие 72 ребенка в возрасте от 10 до 17 лет с диагнозами «гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь» и «хронический гастродуоденит». Работа проведена с одобрения локального этического комитета. Все пациенты старше 14 лет или родители детей младше 14 лет подписали информированное добровольное согласие на проведение обследований. Дети были разделены на две группы: первая группа — дети с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью на фоне хронического гастродуоденита ($n = 37$); вторая — пациенты с хроническим гастродуоденитом ($n = 35$). В качестве контроля использовали результаты обследования 20 здоровых детей соответствующего возраста. Всем больным проводили клиническое исследование, эзофагогастродуоденоскопию по общепринятой методике для верификации диагноза. Определение производных оксида азота в сыворотке крови проводилось колориметрическим методом с использованием реактива Грисса по В. А. Метельской, Н. Г. Гумановой (2005). Определение серотонина в сыворотке крови определялось методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы Serotonin Elisa (Германия). Статистическая обработка полученных данных была проведена с использованием пакета прикладных

программ Statistica 6.1. Нормальность распределения выборки оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Учитывая, что распределение значений результатов исследования во всех анализируемых группах отличалось от нормального, при дальнейшей статистической обработке применялись методы непараметрической статистики. Для сравнения количественных показателей между группами использовали критерий Манна-Уитни.

Результаты. При определении содержания оксида азота в крови у детей с заболеваниями ВОПТ уровень производных оксида азота достоверно превышал значения контрольной группы в 1,5–2,0 раза. Так, показатели нитритов, нитратов и общих метаболитов оксида азота в сыворотке крови были отчетливо повышены у детей с ГЭРБ и хроническим гастроудоденитом по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). При этом максимальные значения наблюдались у больных с хроническим гастроудоденитом в сочетании с рефлюкс-эзофагитом. В ходе работы выяснилось, что у 2/3 наблюдаемых первой группы в слизистой оболочке (СО) пищевода были обнаружены эрозивные изменения и только у 1/3 отсутствие эрозий в пищеводе (НЭРБ). При этом выявлено отличие в содержании производных оксида азота у разных форм ГЭРБ. Установлена прямая корреляционная связь между уровнем производных оксида азота и характером поражением СО пищевода при разных формах ГЭРБ ($r = 0,3$; $p < 0,05$), что подразумевает собой зависимость увеличения значений нитратов и общих метаболитов в сыворотке крови от наличия воспалительно-деструктивных изменений СО пищевода у детей с ГЭРБ. Также отмечали нарастание значений оксида азота в сыворотке крови в зависимости от тяжести воспалительного поражения в пищеводе, на что указывало наличие прямой корреляционной связи по нитритам и общим метаболитам в крови ($r = 0,32$; $p < 0,05$). В ходе исследования было установлено, что у 1/3 детей второй группы наряду с воспалительным процессом СО гастроудоденальной зоны отмечалось нарушение моторики в виде дуоденогастрального рефлюкса (ДГР). При этом показатели нитритов, нитратов и общих метаболитов несколько отличались. Так, у пациентов с ХГД без ДГР в сыворотке крови было выявлено достоверное превышение нитритов по сравнению с больными без ДГР ($p = 0,03$), а уровень нитратов и общих метаболитов незначительно отличался. При определении уровня серотонина в сыворотке крови было выявлено отчетливое его повышение у детей с патологией ВОПТ по сравнению с группой контроля. При этом максимальные цифры отмечались у больных второй группы, у пациентов с ГЭРБ они были несколько снижены. Нами выявлено отсутствие отличий по содержанию серотонина в сыворотке крови у наблюдаемых с ГЭРБ в зависимости от клинической формы и нарастание цифр этого амина в крови при утяжелении течения ГЭРБ. Последнее подтверждалось наличием прямой корреляционной связи между ГЭРБ II степени тяжести и ГЭРБ III степени тяжести ($r = 0,35$; $p < 0,05$) и НЭРБ с ГЭРБ III степени тяжести ($r = 0,39$; $p < 0,05$). У пациентов с ХГД отмечалось изменение серотонина в крови в зависимости от наличия двигательных нарушений желудка в виде ДГР. Выявлено, что у больных

с воспалением СО гастроудоденальной зоны без моторных нарушений цифры серотонина были значительно повышены по сравнению с детьми, у которых на фоне ХГД имелись моторные нарушения пилорического сфинктера. Установлена зависимость увеличения серотонина в сыворотке крови и отсутствия моторных нарушений желудка ($r = 0,87$; $p < 0,05$).

Выводы. Таким образом, для детей с заболеваниями ВОПТ характерен повышенный уровень конечных метаболитов оксида азота и серотонина в сыворотке крови, причем концентрация нитритов и нитратов была максимальной при ГЭРБ, а серотонина при хроническом гастроудодените.

Лабораторная диагностика цитомегаловирусной инфекции у детей с использованием методов иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции

А. И. Пиянзин^{1,2,3}, Е. Н. Жукова³, М. Р. Сапкина³, О. В. Назаровская³, Н. В. Шершнева³

¹ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», ²ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, ³КГБУЗ «Алтайская краевая клиническая детская больница»; г. Барнаул

Laboratory diagnosis of cytomegaloviral infection at children with use of methods of enzyme immunoassay and polymerase chain reaction

A. I. Piyanzin^{1,2,3}, E. N. Zhukova³, M. R. Sapkina³, O. V. Nazarovskaya³, N. V. Shershneva³

¹Altai State University, Barnaul; ²Altai State Medical University; ³the Altai Region Children's Clinical Hospital; Barnaul, Russia

Цель. В настоящее время диагностика цитомегаловирусной инфекции у детей нередко вызывает у врачей затруднения. Это связано с возрастными особенностями иммунитета детского организма и неоднозначностью влияния вируса на различные биологические ткани. В связи с этим целью данной работы было выявление значимости методов иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции в диагностике цитомегаловирусной инфекции у детей.

Пациенты и методы. Обследованы дети в возрасте от четырех дней до 14 лет, проходившие лечение в Алтайской краевой клинической детской больнице. Иммуноферментным методом в сыворотке крови определяли иммуноглобулины классов М и G и avidность к цитомегаловирусу (наборы ЦМВ-IgM, ЦМВ-IgG, ЦМВ-IgG-avidность (ЗАО «Вектор-Бест»). Набор реагентов для выявления ДНК цитомегаловируса человека в клиническом материале (кровь, моча, слюна, спинномозговая жидкость) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией АмплиСенс® CMV-FL (набор ООО «ИнтерЛабСервис»).

Результаты. Сопоставление каждого иммунологического показателя с результатами выявления вируса методом полимеразной цепной реакции выявило некоторые особенности. Положительный тест ЦМВ-IgM и отрицательный результат теста ПЦР — 3,7 %, положительный тест ЦМВ-IgM и положительный результат теста ПЦР —

11 %, отрицательный тест ЦМВ-IgM и отрицательный результат теста ПЦР — 48,4 %, отрицательный тест ЦМВ-IgM и положительный результат теста ПЦР — 29,1 %, сомнительный результат ЦМВ-IgM и отрицательный тест ПЦР — 3,7 %, сомнительный результат ЦМВ-IgM и положительный тест ПЦР — 4,1 %. В случае отрицательного результата ЦМВ-IgM и выявления ДНК вируса методом ПЦР отмечаются высокие показатели ЦМВ-IgG и близкие к пограничным ЦМВ-IgG-авидности или низкие показатели ЦМВ-IgG и низкая ЦМВ-IgG-авидность. Если сомнительный результат ЦМВ-IgM и отрицательный тест ПЦР — высокие показатели ЦМВ-IgG, а авидность близкая к пограничным результатам или низкие значения ЦМВ-IgG, а авидность близкая к пограничным результатам. Когда имел место случай сомнительного результата ЦМВ-IgM и положительного теста ПЦР, отмечаются высокие показатели ЦМВ-IgG и низкая авидность или низкие значения ЦМВ-IgG, но авидность близка к пограничным показателям теста.

Выводы. Для улучшения диагностики различных клинических форм цитомегаловирусной инфекции у детей необходимо одновременное определение иммуноферментным методом специфических IgM, IgG, IgG-авидности и цитомегаловируса методом полимеразной цепной реакции. Для выявления вируса методом ПЦР важно использовать максимально возможное количество биологических жидкостей.

Ложно-положительные реакции на сифилис у детей с хроническими дерматозами

Н. В. Полякова, Н. К. Левчик, Н. В. Зильберберг

ГБУ СО «Уральский НИИ дерматовенерологии и иммунопатологии», г. Екатеринбург

False positive syphilis serology in children with chronic dermatosis

N. V. Polyakova, N. K. Levchik, N. V. Zilberberg

The Ural Institute of Dermatology and Venereology and Immunopathology, Yekaterinburg, Russia

Актуальность. Специфичность лабораторного теста может существенно варьироваться в зависимости от категории пациентов. Большинство хронических дерматозов имеют иммунологический компонент в патогенезе и, следовательно, вероятность измененного антителообразования. Дети различного возраста также существенно различаются по степени зрелости иммунной системы. Недостаточная специфичность скринингового серологического теста приводит к дополнительным материальным и трудовым затратам.

Цель. Изучение специфичности различных серологических тестов при использовании их для скрининга сифилитической инфекции у детей с хроническими дерматозами и клинико-лабораторный анализ случаев ложно-положительных реакций (ЛПР).

Материалы и методы. Исследование проводилось в два этапа. На первом этапе был проведен ретроспективный анализ результатов скринингового обследования детей, поступавших на стационарное лечение в отделение

хронических дерматозов: 200 детей при использовании иммуноферментного анализа (ИФА) и 636 детей при использовании реакции пассивной гемагглютинации (РПГА). В качестве группы сравнения были использованы результаты обследования взрослых пациентов с хроническими дерматозами (739 и 1 186 человек соответственно). Процедура обследования после выявления положительного результата предусматривала повторный забор крови с выполнением расширенного комплекса трепонемных и нетрепонемных тестов и клиническое обследование пациента. На втором этапе было проведено проспективное исследование. У 362 детей с хроническими дерматозами образцы крови были исследованы при помощи комплекса лабораторных тестов (реакция микропреципитации [РМП], реакция связывания комплемента [РСК] с кардиолипидным и трепонемным антигенами, РПГА, ИФА IgG и IgM), остатки образцов алиquotированы для хранения при температуре -80°C . При получении позитивного результата выполнялись повторный забор крови, повторное исследование и клинико-анамнестическое обследование ребенка и родителей. После завершения набора замороженные образцы были подвергнуты углубленному исследованию (общие иммуноглобулины М, G, A, E, маркеры стрептококковой инфекции, вируса Эпштейна-Барра, вируса герпеса восьмого типа, ревматоидный фактор). Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием тестов χ^2 , Cochran Q, Fisher's exact.

Результаты. При проведении скрининга методом ИФА с определением противотрепонемных антител класса G у взрослых пациентов в 24 случаях из 739 был получен положительный результат, из которых ЛПР составили 0,8 % (6), у детей все случаи 1,5 % (3/200) были расценены как ЛПР. При использовании для скрининга РПГА у взрослых среди 1 186 проб были выявлены 24 положительных результата, из них в 0,5 % (6) были констатированы ЛПР, среди 636 проб детей не выявлено ни одного положительного результата (0 %). В ходе сравнительного анализа было установлено, что удельный вес ЛПР у детей и взрослых значительно не различался ($p = 0,176$ для ИФА; $p = 0,62$ для РПГА), однако среди детей удельный вес ЛПР при применении ИФА был достоверно выше ($p = 0,016$), тогда как у взрослых отличия не были существенными ($p = 0,603$). Исследование 362 проб у детей с использованием комплекса лабораторных тестов (РМП, РСК с кардиолипидным и трепонемным антигенами, РПГА, ИФА IgG и IgM), выявило 20 ЛПР, все были получены методом ИФА, при этом достоверно чаще при определении противотрепонемных антител класса М (3,3 %), чем класса G (2,2 %); $p = 0,046$. При этом наблюдались отличия в зависимости от возраста. Удельный вес ЛПР составил: у детей в возрасте 0–3 лет — 8 % (5/62), 4–7 лет — 10 % (8/82), 8–14 лет — 3 % (4/145), 15–17 лет — 4 % (3/73). Было выявлено статистически значимое преобладание ЛПР среди детей в возрасте до семи лет (9,0 % против 3,2 %; $p = 0,033$). Для проверки вероятности связи полученных возрастных отличий с отличиями нозологической структуры обследованных пациентов был проведен сравнительный анализ удельного веса нозологических форм в сравниваемых возрастных группах. Статистически значимых отличий не было получено. При

анализе частоты ЛППР в зависимости от формы дерматоза было установлено, что наиболее часто ЛППР выявлялись при экземе (16%), реже при atopическом дерматите (5%), еще реже при псориазе (1%). Также для выявления возможных причин ЛППР был проведен анализ некоторых иммунологических показателей. Группа сравнения ($n = 36$) была набрана из детей отделения хронических дерматозов без ЛППР на сифилис сопоставимо по возрасту и дерматологическому заболеванию. Выявлены статистически значимые различия в следующих показателях: у детей с ЛППР чаще определялся уровень общих иммуноглобулинов класса М (IgM) выше возрастной нормы (20 и 3% соответственно; $p=0,047$), АСЛ-О выше нормы (> 200 МЕ/мл) (60 и 25%; $p=0,020$) и определялись IgM к капсидному антигену VCA вируса Эпштейн-Барр (25 и 3%; $p=0,018$).

Выводы. 1) Получены данные, свидетельствующие о наличии повышенной вероятности ложно-положительных реакций на сифилис при проведении скрининга методом иммуноферментного анализа у детей с хроническими дерматозами. 2) Формирование ложно-положительных реакций на сифилис у детей с хроническими дерматозами ассоциировано с возрастом 0–7 лет, экзематозными процессами, определенным антителным профилем (повышенное содержание IgM, антитела к бета-гемолизическому стрептококку гр.А, IgM к ВЭБ). 3) Для дальнейшего изучения причин неспецифических реакций при проведении иммуноферментного анализа целесообразно исследование зависимости от особенностей состава тест-систем (иммуносорбента и т.д.).

Возможности иммунодиагностики хронической крапивницы у детей с использованием проточной цитометрии

Н. А. Синельникова, Н. В. Бычкова, Н. М. Калинина, Н. Д. Савенкова

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова» МЧС России; г. Санкт-Петербург

Possibility immune research of chronic urticaria in children by flow cytometry

N. A. Sinelnikova, N. V. Bychkova, N. M. Kalinina, N. D. Savenkova
The Saint Petersburg State Pediatric Medical University; the All-Russian Centre for Emergency and Radiation Medicine n.a. A. M. Nikiforov; Saint Petersburg, Russia

Цель исследования. Расширить возможности диагностики хронической крапивницы у детей с привлечением дополнительных данных, полученных методом проточной цитометрии.

Материалы и методы. Изложены результаты сравнительных исследований активации базофилов, субпопуляционного состава лимфоцитов, уровня IgE общего, пробы с аутосывороткой (ASST) в группе больных детей с хроническим течением крапивницы и группах сравнения (здоровые дети и взрослые без проявлений аллергии и псевдоаллергии, дети с обострением atopического дерматита). Обследованы 50 детей от девяти месяцев до 18 лет (средний возраст $9,40 \pm 0,72$ года) с хронической крапивницей, 15 здоровых детей от 10 месяцев до 18 лет (средний возраст $6,8 \pm 0,84$ года),

30 здоровых взрослых от 18 до 60 лет (средний возраст 45 ± 5 лет) без проявлений аллергии и псевдоаллергии и 70 детей от одного года до 13 лет (средний возраст $4,3 \pm 3,5$ года) с atopическим дерматитом в стадии обострения с разной степенью тяжести заболевания. Изучение активации базофилов проводили методом проточной цитометрии (FC 500, Beckman Coulter, США) в цельной гепаринизированной крови с использованием набора Allergenicity kit (Cellular Analysis of Allergy, Beckman Coulter) в соответствии с инструкцией к набору. В пробе каждого пациента были проанализированы 500 базофилов, для четкой идентификации которых были использованы параметры прямого и бокового светорассеяния, моноклональные антитела к CD294 и CD203c. Применяя многоэтапное гейтирование, в каждой пробе было оценено относительное количество активированных базофилов с фенотипом CD3-CRTh2+CD203c++, а также Т-хелперов 2 с фенотипом CD3+CD294+. Субпопуляционный состав лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии в многоцветном анализе с использованием моноклональных антител линии IOTest (Beckman Coulter). После подготовки проб по методике «окраска — лизис с фиксацией — отмывка» анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC 500 (Beckman Coulter). Оценивали содержание В-лимфоцитов (CD19+), Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов (CD3+CD4+), Т-цитотоксических (CD3+CD8+), NK-клеток (CD3-CD16+CD56+), NKT-клеток (CD3+CD16+56+), активированных NK-клеток (CD3-CD8+), CD3+HLA-DR+-клеток. Определение концентрации IgE общего в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа («Хема», Россия). Детям с хронической крапивницей старшего возраста проводили пробу с аутосывороткой (autologous serum skin test, ASST). Статистический анализ осуществлялся с использованием непараметрических тестов (Wilcoxon – Mann – Whitney), корреляционного анализа (Spearman rank correlation coefficient). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. При изучении спонтанной активации базофилов в группе пациентов с крапивницей было выявлено повышение этого показателя у 25 (47%) детей, а у девяти (19%) пациентов активация была более 16,5% с максимальными значениями до 68%, что, по данным литературы, расценивается как косвенный признак аутоиммунной крапивницы (референтный интервал спонтанной активации базофилов 0–8%). В процессе исследования показано, что в группе пациентов с хронической крапивницей спонтанная активация базофилов была выше, чем у здоровых лиц ($p < 0,05$), что определяется иммунными и неиммунными факторами в патогенезе заболевания. Результаты внутрикожного тестирования (ASST) и положительная корреляция со степенью выраженности активации базофилов ($r = 0,6$) позволили у старших детей в 75% случаев диагностировать аутоиммунную форму крапивницы. При изучении корреляционных связей между показателями общего IgE и спонтанной активацией базофилов выявлена статистически достоверная положительная корреляция между этими показателями в группах пациентов с крапивницей и с обострением atopического дерматита, что указывает на общую направленность иммунного ответа. Показана меньшая положительная парная корреляция между уровнем

IgE общего и относительным количеством Th2 в группе детей с хронической крапивницей ($r = 0,3$) по сравнению с группой пациентов с atopическим дерматитом ($r = 0,6$), что говорит о большем вкладе IgE-зависимых реакций в воспаление при atopическом дерматите. У 25 детей с тяжелым и среднетяжелым течением хронической крапивницы изучали субпопуляционный состав лимфоцитов для исключения нарушений клеточного звена иммунитета, учитывая тяжесть и длительность заболевания. В группе пациентов с хронической крапивницей были выявлены следующие особенности: относительное количество В-лимфоцитов у 22 (86%) человек находилось в пределах нормы; абсолютное количество CD19+ снижено у четырех (13%) человек; относительное количество Т-лимфоцитов умеренно повышено у 13 (53%) человек, но при оценке средних значений данный показатель не отличался от группы сравнения и находился в пределах референтного интервала; относительное повышение Т-хелперов выявлено у пяти (20%) человек; соотношение Т-хелперы / Т-цитотоксические повышено у 13 (53%) человек, что может быть связано с миграцией CD3+CD8+-клеток в органы мишени. У детей с обострением atopического дерматита относительное количество Т-лимфоцитов было выше, чем в других группах, и выходило за рамки референтного интервала ($p < 0,05$). При оценке относительного количества Th2 в группах детей и взрослых были выявлены следующие результаты: относительное количество Th2 у детей с хронической крапивницей не выходило за рамки референтного интервала у 42 (90%) человек; у восьми (10%) пациентов этот показатель колебался от 0,7 до 1,1%; уровень Th2 в контрольных группах здоровых детей и взрослых находился в пределах нормы и составлял от 0,1 до 0,4% в контрольной группе детей и от 0,5 до 0,7% в контрольной группе взрослых; у пациентов с обострением atopического дерматита относительное количество Th2 было самым высоким и достоверно отличалось от данного показателя в группе здоровых детей, а также от количества Th2 в группе детей с хронической крапивницей ($p < 0,05$).

Выводы. В ходе исследования показана эффективность применения метода проточной цитометрии для диагностики хронической крапивницы. Тесты на активацию базофилов и субпопуляционный состав лимфоцитов *in vitro* — доступные и перспективные методы исследования. Они подходят как для экспериментальных и фармакологических исследований, так и для диагностики в клинической практике с целью динамического наблюдения иммунологических нарушений, приводящих к персистированию хронической крапивницы в детском возрасте. Особенности активации базофилов, сочетание с другими иммунологическими показателями (уровень IgE и относительное количество Th2) и результаты пробы с аутосывороткой (ASST) указывают на промежуточное положение хронической крапивницы в ряду аллергических заболеваний, отличая иммунные механизмы от IgE-зависимых реакций. Представленные данные субпопуляционного состава лимфоцитов у детей с хронической крапивницей отражают дисбаланс между Т-хелперами и Т-цитотоксическими лимфоцитами. Отмечается преобладающая роль Т-клеточного звена с Th2-девиацией иммунного ответа. Полученные данные свидетельствуют

о повышенном содержании активированных эффекторных Т-хелперов в периферической крови пациентов с хронической крапивницей, иммунный ответ у которых развивается преимущественно по Т-хелперному второму типу.

Возможность оценки состояния новорожденного после родов по клеточному составу пуповинной крови и крови матери

Д. А. Шмаров, А. К. Блбулян

ГБУЗ г. Москвы «Инфекционная клиническая больница № 1» Департамента здравоохранения г. Москвы; Институт перинатологии, акушерства и гинекологии, г. Ереван, Армения

Opportunity assessment of newborn after childbirth cellular composition umbilical blood of mother

D. A. Shmarov, A. K. Blbulyan

The Infectious Diseases Clinical Hospital № 1, Moscow; the Institute of Perinatology, Obstetrics and Gynecology, Yerevan, Armenia

Даже при нормально протекающих родах организм подвергается интенсивной нагрузке, которая в значительной части случаев приводит к повреждению — дистрессу (гипоксии и асфиксии) плода. Разработка способов оценки состояния новорожденного непосредственно после родов является весьма актуальной задачей. Нами была предпринята попытка на основе анализа клеточного состава пуповинной крови и крови матери найти параметры для проведения такой оценки.

Цель исследования заключалась в сравнительном анализе показателей клеточного состава крови матери и пуповинной крови после родов для выработки критериев, позволяющих оценить состояние новорожденного.

Материалы и методы. Исследовали клеточный состав крови с применением проточного счетчика среднего класса Cobas Micros 18 OT (ABX, Франция). Образцы крови изучали у 55 практически здоровых женщин непосредственно после родов. Также изучали кровь плода (пуповинную кровь), которую брали сразу после рождения ребенка из пуповинной вены. У 14 женщин при родах применяли амниотомию. Кроме стандартных 18 параметров анализировали также адаптационный индекс (АИ) Л. Х. Гаркави (1965), который вычисляли как отношение содержания лимфоцитов к гранулоцитам. Результаты рассматривали в трех группах: в первую ($n = 18$) вошли показатели у впервые рожавших женщин, во вторую ($n = 14$) у рожавших повторно, в третью ($n = 9$) — в третий и четвертый раз. В группе с амниотомией из 14 женщин восемь рожали впервые, пятеро во второй раз и одна в третий раз.

Результаты. Было установлено, что при родах у здоровых женщин отмечаются определенные сдвиги в клеточном составе периферической крови; наиболее выраженные со стороны содержания лейкоцитов: значительный лейкоцитоз у беременных в период начала родовой деятельности увеличивается непосредственно после родов, что можно рассматривать в качестве адаптационной реакции организма. У повторно рожавших женщин эта реакция выражена в меньшей степени, чем у впервые рожавших, что проявляется в более низких цифрах содержания лейкоцитов. Лейкоцитоз при родах сопровождался увеличением значений АИ. В пуповинной крови (крови плода) установлено

достоверное повышение лейкоцитов в случае первых родов по сравнению с повторными родами. Для изучения взаимосвязи показателей крови матери и пуповинной крови (крови плода) исследовали корреляционные зависимости между полученными параметрами в разных группах. Были выявлены высокая положительная линейная корреляция ($R = 0,91$; $n = 9$; $p < 0,001$) между эритроцитами плода и уровнем АИ матери после третьих и четвертых родов, тогда как в других группах (после первых и вторых родов) такой корреляции не прослеживалось. Степень физиологического эритроцитоза обычно соответствует более высокой двигательной активности организма, в данном случае плода. Можно предположить, что корреляция эритроцитоза плода с АИ крови матери связана с характером протекания родов. В случае благоприятного протекания родовой деятельности плод обладает достаточной двигательной активностью, что ассоциируется с более высокими значениями адаптационного индекса и более благоприятным протеканием беременности. В других группах, после первых и вторых родов, большая часть точек на кривой проецировалась в область, соответствующую зависимости, полученной при анализе данных третьей группы (третьи и четвертые роды), другие точки были локализованы правее, в виде двух кластеров. Зависимость между параметрами в этих группах мы попытались представить в виде двух кривых, которые легли параллельно и имели такой же наклон, что и линия тренда на основной кривой. Таким образом, зависимость эритроцитов плода и АИ крови матери после родов в общей группе имела сложный характер, который мы представили в виде трех кривых, имеющих приблизительно одинаковый наклон относительно оси абсцисс. Первая кривая соответствовала зависимости, полученной при изучении корреляции между этими параметрами после третьих и четвертых родов ($R_1 = 0,81$; $n = 27$; $p < 0,00007$), вторая находилась несколько правее ($R_2 = 0,89$; $n = 10$; $p < 0,00003$), а третья еще правее ($R_3 = 0,95$; $n = 4$; $p < 0,05$). Таким образом, АИ родильниц линейно коррелировал с содержанием эритроцитов плода в трех диапазонах (на трех уровнях). Поскольку известно, что третьи и четвертые роды протекают, как правило, более благоприятно, что связывают с большей степенью готовности родовых путей, мы предположили, что такой трехуровневый тип зависимости отражает взаимосвязь уровня дистресса (гипоксии) плода (степень эритроцитоза) и адаптационной реакции (родового стресса) организма родильницы. В случае третьих (четвертых) родов регистрируемые показатели были стабильны и достаточно строго коррелировали. Это ассоциируется с положением о более благоприятном и, следовательно, стабильном протекании родов; гипоксия плода при этом выражена в легкой степени и не приводит к дистрессу. В первых и вторых родах гипоксия выражена в средней и тяжелой степени, что в отдельных случаях приводит к дистрессу плода; эти точки проецируются в область второй и третьей кривой. После первых родов только девять точек (50 %) локализовались в области первой кривой, семь (38,9 %) — второй и две (11,1 %) — третьей кривой. После вторых родов девять точек (64,3 %) локализовались в области первой кривой, три (21,4 %) — две (14,3 %) — третьей кривой. Была получена математическая формула, позволяющая вычислять индекс дистресса (ИД), на основе которого можно попытаться количественно охарактеризовать степень дистресса плода:

$ИД = (RBC \times 0,12 - 0,36) / АИ$, где RBC — содержание эритроцитов плода; АИ — адаптационный индекс родильницы. Характер зависимости между эритроцитами плода и уровнем адаптационного индекса матери существенно отличался от нормы в том случае, если при родах применялась амниотомия. Большая часть (50 %) точек локализовались значительно левее остальных графиков, кривая имела более крутой наклон относительно оси абсцисс ($R = 0,84$; $p < 0,02$; $n = 7$). Остальные точки были расположены по такому же типу, как при нормальных родах и проецировались в область первого и второго уровня. Такой характер зависимости подтверждает наше предположение о том, что характер кривой отражает степень дистресса и свидетельствует о том, что амниотомия может способствовать снижению уровня дистресса плода при родах и является адекватным способом родовспоможения.

Выводы. Выявлена прямая положительная корреляционная зависимость содержания эритроцитов плода от адаптационного индекса крови матери (АИ) по Л. Х. Гаркави в случае третьих и четвертых родов. При оценке родового стресса по адаптационному индексу крови родильницы его связь с содержанием эритроцитов крови новорожденного (плода) имеет дискретный характер. Предложена формула, по которой, исходя из значений адаптационного индекса родильниц и эритроцитов плода (новорожденного), можно вычислить индекс дистресса ($ИД = (RBC \times 0,12 - 0,36) / АИ$). На основе ИД можно проводить достаточно строгое разделение между группами. При амниотомии в значительной части случаев (50 %) ИД имел более низкие значения, чем в нормальной группе, что может быть связано с более благоприятным протеканием родов и косвенно свидетельствовать о правомерности предлагаемого подхода.

XI. Лабораторные методы общеклинических исследований

Импортозамещение в лабораторной медицине для неинвазивной диагностики предопухолевых заболеваний слизистой оболочки желудка

О. Ю. Дорн^{1,2}, М. А. Шеховцова², С. А. Песков^{1,2},
Е. Г. Степанова², М. В. Паламарчук², Е. А. Цикаленко^{1,2},
Л. В. Вохминцева²

¹ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, ²ГБУЗ НСО «Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр», г. Новосибирск

Import substitution in laboratory medicine for noninvasive diagnosis of precancerous diseases of gastric mucosa

O. Yu. Dorn^{1,2}, M. A. Shekhovtsova², S. A. Peskov^{1,2}, E. G. Stepanova², M. V. Palamarchuk², E. A. Tsikalenko^{1,2}, L. V. Vokhmintseva²

¹Novosibirsk State Medical University; ²the Novosibirsk State Regional Clinical Diagnostic Centre; Novosibirsk, Russia

В настоящее время в лабораторной медицине актуальным является вопрос об импортозамещении с целью снижения себестоимости исследований. Неинвазивная диа-

гностика заболеваний слизистой оболочки желудка (СОЖ) занимает значимую позицию в решении данного вопроса, так как данная диагностика лежит в основе профилактики рака желудка и должна быть максимально доступна для пациентов. Неинвазивная диагностика СОЖ включает в себя комплексное исследование в сыворотке крови гормонов СОЖ (пепсиногена-1, пепсиногена-2 и гастрин-17) и инфекции *Helicobacter pylori*. Такой диагностический комплекс позволяет определить состояние и функциональную активность всей СОЖ. Этот метод исследования является неинвазивным, безопасным и удобным для пациента. Длительное время компания ВІОНІТ (Финляндия) была единственным производителем тест-систем данного направления клинической лабораторной диагностики, представляя комплекс наборов реагентов под названием Gastro Panel. Результаты исследования Gastro Panel обрабатываются статистической программой Gastro Soft. Это программный продукт компании ВІОНІТ, который позволяет оценить каждый клинический случай с подробной интерпретацией полученных результатов, выставлением предполагаемого диагноза и дальнейшими рекомендациями, основанными на соглашениях Европейского съезда гастроэнтерологов (Маастрихт, 2000). Однако несколько лет назад компания «Вектор-Бест» (Новосибирск) представила для использования в клинической практике диагностические наборы для определения пепсиногена-1 (ПГ1) и пепсиногена-2 (ПГ2).

Цель. Оценить возможность использования диагностических наборов для определения ПГ1 и ПГ2 («Вектор-Бест», Россия) в комплексной диагностике заболеваний СОЖ для верификации предопухолевых заболеваний желудка.

Материал и методы. Обследованы 80 пациентов различного клинического профиля. В сыворотке крови всех обследуемых лиц определяли концентрацию ПГ1 и ПГ2 методом твердофазного иммуноферментного анализа параллельно с использованием наборов реагентов разных фирм производителей: «Пепсиноген 1-ИФА-Бест» и «Пепсиноген 2-ИФА-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск), а также наборов реагентов «Пепсиноген 1» и «Пепсиноген 2», входящих в состав тест-системы Gastro Panel (ВІОНІТ, Финляндия). Исследование гастрин-17 в сыворотке крови проводили также параллельно методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов компании ВІОНІТ и с помощью метода хемилюминесценции на автоматическом анализаторе IMMULITE 2000 (Siemens, США). Для определения титра антител к *Helicobacter pylori* у обследуемых пациентов использовали наборы реагентов «*Helicobacter pylori*-CagA-антитела-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест»). Полученные данные ПГ1, ПГ2 и Г17 обрабатывались специализированной статистической программой Gastro Soft с определением различных типов поражения желудка (гастриты неатрофический, атрофический фундальной и (или) антральной локализации). Причем для каждого пациента программа Gastro Soft использовалась дважды: для обработки результатов, полученных с помощью тестов компании ВІОНІТ, и второй раз для обработки результатов, полученных с помощью наборов реагентов «Вектор-Бест» и Siemens. Статистическая обработка проводилась с применением пакетов программы SPSS 13.0. Для распределений рассчитывали средние значения (М) и стан-

дартные отклонения (среднеквадратическое отклонение σ), результаты представлялись в виде $M \pm \sigma$. Для сравнения выборок данных анализировали расхождение предполагаемого диагноза для каждого пациента по заключениям статистической программы Gastro Soft.

Результаты. В результате проведенных исследований наборами реагентов Gastro Panel из 80 обследованных пациентов у шести были обнаружены лабораторные признаки атрофического фундального гастрита, у двух признаки атрофического антрального гастрита, у 24 человек признаки неатрофического гастрита с повышенной секрецией, у 30 пациентов выявлена инфекция *Helicobacter pylori* без изменения уровня желудочных гормонов и у 18 человек не выявлено патологических изменений по всем исследуемым параметрам. В группах обследованных с признаками атрофического гастрита различной локализации положительный результат на наличие *Helicobacter pylori* был обнаружен у пяти человек (у четырех из шести пациентов с атрофическим фундальным гастритом и у одного пациента с атрофическим антральным гастритом). Данные пациенты вошли в группу высокого риска по развитию рака желудка. Анализ параллельных отчетов по программе Gastro Soft показал полное соответствие выявленных изменений СОЖ — предполагаемый диагноз совпадал в 100 % случаев для каждого пациента. Это позволило нам сделать вывод о возможности дальнейшего использования диагностических наборов «Вектор-Бест» и Siemens для комплексной неинвазивной диагностики заболеваний СОЖ.

Выводы. Таким образом, полученные результаты подтверждают возможность использования диагностических наборов для определения ПГ1 и ПГ2 (Вектор-Бест, Россия) для комплексной неинвазивной диагностики заболеваний СОЖ. Использование отечественных тестовых систем является экономически эффективным, так как позволяет снизить себестоимость исследования более чем в два раза и сделать высокоинформативную диагностику заболеваний СОЖ доступной для пациентов, что в конечном итоге должно отразиться на выявляемости предопухолевых изменений желудка. Именно ранняя выявляемость предопухолевых заболеваний лежит в основе профилактики рака желудка.

Оптимизация процесса производства порошка «ВАГИЛ-ШФ» на базе ТОО «Шансаров-Фарм»

Ж. Б. Бекболова, И. Абибуллаева, А. Орынбекова, А. Сабит, Б. А. Досжанова

РГП «Казахский национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова», г. Алматы, Казахстан, модуль «фармацевт-технолог»

Optimization of production process of 'VIGIL-ShF' powder in Shansarov-Farm Co.

Zh. B. Bekbolova, I. Abibullaeva, A. Orynbeкова, A. Sabit, B. A. Doszhanova

The Kazakh National Medical University n.a. S. D. Asfendiyarov, Almaty, Kazakhstan

Актуальность проблемы. Воспалительные заболевания женских половых органов занимают первое место (55–70 %) в структуре гинекологических заболеваний

и являются одной из причин нарушения многих функций органов и систем женского организма. Эти заболевания часто проявляют склонность к хроническому рецидивирующему течению, что заставляет думать об улучшении производства лекарственных средств для их лечения [1].

Цель исследования. Оптимизировать процесс производства антисептического, антимикробного, противозудного препарата для лечения заболеваний женских половых органов — порошка «Вагил-ШФ» на базе ТОО «Шаншаров-Фарм».

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являются: порошок Вагил-ШФ (для приготовления водно-щелочного раствора для обработки наружных и мочеполовых органов и влагалища); емкость «Дежа»; деревянная мешалка; упаковочный аппарат; первичная тара — пакет-саше. В результате маркетинговых исследований по изучению фармацевтического рынка вагинальных лекарственных форм было выявлено, что от общего числа зарегистрированных в государственном реестре РК 7227 лекарственных средств 86 препаратов, то есть 1,1 %, относятся к вагинальным лекарственным формам. Из них вагинально используемые суппозитории — 37, вагинальные таблетки — 19, порошки — 4, пессарий — 3, гели — 6, растительные масла — 3, крема — 6, вагинальные капсулы — 5, растворы — 2, а также вагинальное кольцо — 1 зарегистрированы. На базе ТОО «Шаншаров-Фарм» разработаны алгоритмы проекта по оптимизации технологического процесса смешивания: деревянную мешалку заменили на В-образную мешалку модели V-500. Разработаны рекомендации по замене упаковочного аппарата порошка из флаконов в пакеты-саше. При этом положительные стороны упаковки в пакеты-саше следующие: весь процесс — дозирование, формирование пакета из рулона ленты, заполнение его продуктом, герметичное запаивание пакета, его отрезание и подача его по отводящему конвейеру происходит автоматически, значит, риск загрязнения препарата отсутствует. Производительность машины HP100 G 50–60 пакетов в минуту, а затрата времени на всю серию продукции составляет два часа, что в 1,5 раза меньше, чем используемый аппарат на базе.

Результаты исследования. В технологический процесс смешивания ингредиентов порошка «Вагил-ШФ» нами был предложен другой, более высокоэффективный, с разумной конструкцией, удобный в управлении, равномерно смешивающий, с гладкой внутренностью и удобный при очистке смеситель типа V. Данный вид смесителя используется в фармацевтической и химической промышленности для смешивания сухого порошка и гранулированных материалов. Благодаря уникально спроектированному барабану смешивания данное оборудование имеет высокую эффективность. Время и скорость смешивания нового оборудования увеличились в два раза, рентабельность составляет 70 %.

Вывод. Проводился маркетинговый анализ рынка, где выявлено, что количество вагинальных лекарственных средств очень мало, и наша цель — производить больше отечественных вагинальных препаратов. В процесс смешивания нами был включен другой высокоэффективный смеситель типа V. Такой аппарат позволит сократить

время смешивания и улучшить качество порошка. Также нами был предложен упаковочный аппарат HP100 G, чтобы заменить выпускаемые полимерные флаконы в пакеты-саше.

Опыт оценки жизнеспособности лейкоцитов в лейкоконcentратах, содержащих гемопоэтические стволовые клетки

Н. В. Исаева, И. В. Парамонов, Н. В. Минаева, Г. А. Зайцева, Н. А. Зорина, Ф. С. Шерстнев, С. В. Утемов, А. А. Костяев, К. А. Ветошкин

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» ФМБА России, г. Киров

Experience of assessing viability of leukocytes in leukocyte concentrates containing hematopoietic stem cells

N. V. Isaeva, I. V. Paramonov, N. V. Minaeva, G. A. Zaytseva,

N. A. Zorina, F. S. Sherstnev, S. V. Utemov, A. A. Kostyaev, A. K. Vetoshkin
The Kirov Scientific and Research Institute for Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russia

Актуальность. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в настоящее время считается эффективным методом терапии гемобластозов и депрессий кроветворения. Наиболее часто применяемым продуктом клеточной терапии при этом является ГСК-содержащий лейкоконцентрат (ЛК). Одним из важнейших факторов, влияющих на успех трансплантации, является быстрое, полноценное восстановление гемопоэза и стабильная функция трансплантата. Поэтому абсолютно обоснованным требованием комитета по аккредитации European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) является организация контроля качества клеточного продукта. Среди ряда критериев немаловажную роль играет лабораторное подтверждение жизнеспособности клеток. Контроль жизнеспособности клеток рекомендуется осуществлять путем автоматизированного тестирования с использованием красителя 7-аминоактиномицин D (7-AAD), а результаты микроскопических методов оценки жизнеспособности, если они применяются в учреждении, сопоставлять с данными теста на 7-AAD-позитивность. В КНИИГиПК ФМБА России на протяжении более 15 лет производится заготовка и клиническое использование как аутологических, так и аллогенных концентратов ГСК, при этом получение последних осуществляется и для других трансплантационных центров РФ.

Цель работы состояла в анализе числа жизнеспособных лейкоцитов в ГСК-содержащих ЛК на этапах их получения и хранения.

Материалы и методы. Изучали кровь больных онкогематологическими заболеваниями ($n = 125$) и доноров ($n = 44$), взятую в утренние часы непосредственно перед началом аппаратного лейкоцитафереза. ЛК анализировали сразу после их получения. ЛК больных, направляемые на дальнейшее хранение в замороженном состоянии, оценивали после смешивания с консервантом — 10-процентным раствором диметилсульфоксида (ДМСО). Следующей контрольной точкой явился момент оттаивания ЛК после хранения в парах жидкого азота перед клиническим использованием. В указанных образцах выполняли подсчет числа

ГСК методом проточной цитометрии согласно протоколу ISHAGE при двухпараметрическом иммунологическом связывании с флуорохром-конъюгированными антителами CD45/CD34 и одновременным тестом на жизнеспособность с витальным красителем 7-AAD. Как известно, 7-AAD интеркалируется между цитозиновыми и гуаниновыми основаниями ДНК с образованием прочного комплекса ДНК-7-AAD, при этом он является ярким флуорохромом с длиной испускаемого света около 650 нм. Число 7AAD⁺-лейкоцитов характеризует число клеток с проницаемой мембраной. Цитометрический протокол подсчета ГСК, формируя их числовое значение в образце, предполагает исключение из анализа всех нежизнеспособных лейкоцитов. В данном исследовании регистрировали содержание 7-AAD⁺-лейкоцитов во всех оцениваемых образцах крови и ЛК в качестве самостоятельного параметра сохранности.

Результаты. Содержание 7-AAD⁺-лейкоцитов в ЛК перед замораживанием практически не отличалось от такового в образцах крови, из которых их получали методом аппаратного лейкоцитафереза: у больных 0,39 (0,21; 0,58)% против 0,31 (0,15; 0,86)%; у доноров 0,30 (0,2; 0,81)% против 0,23 (0,2; 0,45)%. Следует отметить, что ЛК, заготовленные от доноров с целью аллогенной трансплантации, в ряде случаев могут транспортироваться в другое учреждение. Ведется работа по оценке данной качественной характеристики трансплантационного материала в смоделированных условиях хранения и транспортировки. Изучаемый параметр в криоконсервированных ЛК больных более широко варьировал, однако существенно не превышал таковой в нативных ЛК. Содержание 7-ADD⁺-лейкоцитов в ЛК больных после оттаивания варьировало от 0,5 до 38%, составив в среднем 5 (2,0; 8,1)%, и было существенно выше, чем измеренное перед ДМСО-криоконсервированием изучаемой биосреды ($p < 0,001$). Число нежизнеспособных лейкоцитов в оттаявших ЛК на уровне 0,5–5,0% регистрировали в 52% образцов, 5,1–10,0% — в 28%, 10,1% и выше — в 20%. Отмечено отсутствие корреляции числа 7-AAD⁺ лейкоцитов с длительностью хранения биоматериала в замороженном состоянии под протекцией ДМСО в парах жидкого азота. Установлено, что регион 7-ADD⁺-событий в меньшей степени представлен лимфоцитоподобными элементами, а в наибольшей содержал гранулоциты (миелоциты, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, эозинофилы и базофилы), присутствующие в достаточном количестве в ГСК-содержащих ЛК. Полученные результаты соответствовали данным теста на эозинорезистентность.

Выводы. Процедура аппаратного лейкоцитафереза не оказывает негативного влияния на жизнеспособность лейкоцитов в ЛК, полученных как от больных онкогематологическими заболеваниями, так и от доноров. Определен диапазон значений 7-ADD⁺-лейкоцитов в нативных ЛК, заготавливаемых в учреждении. Снижение жизнеспособности лейкоцитов в процессе криоконсервирования с ДМСО в некоторых образцах ЛК является ожидаемым фактом, что требует углубленного изучения этого процесса. При замораживании ГСК-содержащих ЛК, их хранении до трансплантации и оттаивании возрастает число лейкоцитов с поврежденной мембраной, при этом срок хранения не сказывается на проницаемости мембран лейкоцитов.

В ряде случаев в размороженных образцах уровень нежизнеспособных лейкоцитов может достигать критических значений. При этом данные, полученные с применением флуоресцентного красителя и лазерной проточной цитофлуориметрии, в целом совпадают с результатами микроскопического метода оценки. Хотя менее стабильным с точки зрения структурной целостности после размораживания оказывается пул гранулоцитов, в дальнейшем актуален анализ эффективности таких ЛК в отношении восстановления гемопоэза у больных после трансплантации. Только такой анализ, согласно требованиям ЕВМТ, позволит определить диапазон приемлемых значений жизнеспособности клеток в получаемом клеточном материале в учреждении. Данные об уровне жизнеспособности ЛК после размораживания имеют большое практическое значение, поскольку далеко не все трансплантационные центры, включая зарубежные, имеют возможность выполнять такую оценку клеточного материала в связи в большой территориальной разобщенностью задействованных структур. Возможные потери в процессе хранения и транспортировки должны учитываться при заготовке планируемой трансплантационной дозы ГСК.

Опыт использования панели CytoDiff для скрининга пациентов с лимфоцитозами неясного генеза

А. А. Калашникова, Т. Г. Цветкова

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

Experience in use of 'CytoDiff' panel for screening patients with limfocitosis of unknown origin

A. A. Kalashnikova, T. G. Tsvetkova

The All-Russian Centre for Emergency and Radiation Medicine n.a. A. M. Nikiforov, Saint Petersburg, Russia

В клинической практике часто возникает необходимость выяснения причины лимфоцитоза. Исследование, включающее клинический анализ крови и фенотипирование лейкоцитов с использованием панели CytoDiff, позволяет проводить дифференциальную диагностику между реактивным лимфоцитозом и лимфоцитозом, связанным с опухолевой трансформацией. Панель CytoDiff удобна для скрининга гематологических нарушений, поскольку позволяет корректно определить процент аномальных клеток крови, в том числе бластных, при первичной диагностике и мониторингировании гематологических больных.

Цель исследования. Оптимизация рутинного скринингового исследования клеток крови с использованием панели CytoDiff у пациентов с лимфоцитозом неясного генеза.

Материалом исследования была периферическая кровь 55 пациентов ВЦЭРМ МЧС России с изменениями в клиническом анализе крови. Выполнялся клинический анализ крови (LH750, Beckman Coulter), с подсчетом лейкоформулы. При наличии относительного лимфоцитоза (33 образца, из них в 25 случаях абсолютный лимфоцитоз) проводили фенотипирование лейкоцитов. Использовали панель моноклональных антител CytoDiff (Beckman Coulter) для IVD-диагностики основных популяций лейкоцитов методом проточной цитометрии (Cytomics FC500, Beckman Coulter) CD36FITC / CD2PE / CD294PE /

CD19ECD / CD16PC5 / CD45PC7. Определяли относительное количество нейтрофилов, моноцитов и их субпопуляций (классические и провоспалительные), эозинофилов, базофилов, бластов, лимфоцитов и их субпопуляций (В-клетки [CD45+brightCD19+] и Т+NK-лимфоциты [CD45+brightCD2+SSCdim]). Результаты сопоставлялись с данными медицинских карт пациентов.

Результаты и обсуждение. У пациентов с относительным лимфоцитозом отмечалось повышение доли Т+NK-лимфоцитов наряду с нормальными значениями В-клеток (Т+NK%: $50,8 \pm 5,0$; В%: $4,4 \pm 0,7$) от общего количества лейкоцитов CD45+. В 75 % случаев это были пациенты с активной вирусной инфекцией (по результатам ПЦР). В группе пациентов с относительным и абсолютным лимфоцитозом в 16 % случаев (четыре человека) отмечалось повышение доли В-клеток и снижение популяции Т+NK-лимфоцитов. Из них у двух пациентов был диагностирован ХЛЛ, и у двух пациентов — другие ВЛПЗ, причем у последних абсолютное количество лимфоцитов не превышало 5000. В 12 % случаев (три человека) отмечалось значительное повышение популяции Т+NK-лимфоцитов и снижение доли В-лимфоцитов (Т+NK%: $79,6 \pm 4,5$; В%: $1,1 \pm 0,2$). При дальнейшем обследовании у этих пациентов был диагностирован инфекционный мононуклеоз. В остальных случаях (72 %, 18 человек) имел место реактивный лимфоцитоз с увеличением популяций как В-, так и Т+NK-лимфоцитов (Т+NK%: $47; 2 \pm 6; 5$; В%: $8,1 \pm 3,0$).

Вывод. Использование панели CytoDiff существенно оптимизирует диагностику при лимфоцитозах неясного генеза, поскольку на этапе скринингового исследования делает возможным предварительную дифференциальную диагностику реактивного лимфоцитоза и опухолевой трансформации. Исследование CytoDiff позволяет предположить наличие В-клеточного лимфопролиферативного заболевания даже в случае незначительного абсолютного лимфоцитоза.

Синдром Гудпасчера, алгоритмы лабораторной диагностики

С. П. Казаков^{1,2}, С. Б. Путков, Г. Н. Родкина¹, Р. А. Моруга¹, А. Г. Борисов¹

¹ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н. Н. Бурденко» Минобороны России, ²ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России; г. Москва

Gudpascher's syndrome, laboratory diagnostic algorithms

S. P. Kazakov^{1,2}, S. B. Putkov, G. N. Rodkina¹, R. A. Moruga¹, A. G. Borisov¹

¹The Main Military Clinical Hospital n.a. N.N. Burdenko; ²The Russian Medical Academy for Postgraduate Education; Moscow, Russia

Введение. Синдром Гудпасчера (СГ) — редко встречающееся агрессивное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, быстро приводящее к инвалидизации или гибели пациента. Заболевание может развиваться у обоих полов в разных возрастных группах, но чаще выявляется у мужчин в возрасте до 40 лет и мужчин, и женщин в возрасте после 60 лет. Заболеваемость составляет порядка одного человека на два миллиона в год. В ГВКГ имени Н. Н. Бурденко за последние 10 лет находились на лечении шесть пациентов с СГ. Основным патофизиологическим механизмом

развития СГ является повреждение соединительной ткани преимущественно почек и легких, приводящее к кровотечениям из них и стойкому нарушению их функций.

Цель работы. Разработать наиболее оптимальные скрининговые, мониторинговые и диспансерные алгоритмы лабораторной диагностики и наблюдения за пациентами с СГ.

Материалы и методы. Были исследованы шесть клинических случаев у пациентов с установленным диагнозом СГ, находившихся на лечении в ГВКГ имени Н. Н. Бурденко в период с 2005-го по 2014 год. Материал проанализирован по результатам историй болезни и базам данных лабораторных исследований, в процессе которого сформировались представленные скрининговые, мониторинговые и диспансерные схемы алгоритмов у пациентов с СГ.

Результаты работы. В патогенезе заболевания СГ основным ключевым элементом являются нарушения, происходящие в центральных органах иммунной системы, связанные с нарушениями негативной селекции В-клеток иммунной системы, приводящие к образованию патологического клона В-лимфоцитов, вырабатывающих аутоантитела к базальной мембране клубочков почек (Ат. к БМК) и легких. Уровень антител может подниматься до 1000 ед./мл и выше при норме от 0 до 20 ед./мл, что является одним из скрининговых лабораторных показателей, подтверждающих данное заболевание. Повышенная выработка антител приводит к запуску целого каскада патологических реакций, прежде всего в легких и почках с выраженными изменениями в этих органах вплоть до утраты их функций. Эффективность терапии и прогноз заболевания во многом зависели от ранней постановки диагноза и своевременно назначенной профилактической борьбы с развивающейся острой почечной недостаточностью (своевременно проводимым гемодиализом), проведения плазмафереза и правильно спланированной и проводящейся иммуносупрессивной терапии, например, Рутуксимабом (Мабтерой), пульс-терапии Солумедролом. Прием Рутуксимаба приводит к поражению клона клеток, несущих на своей поверхности рецептор CD20+. Данный препарат способствует в первую очередь подавлению В-клеточного звена иммунной системы на период от нескольких месяцев до нескольких лет. Базируясь на данных проведенных собственных исследований, мы предлагаем перечень лабораторных исследований, на котором должен базироваться скрининговый алгоритм диагностики данного заболевания. Он включает определение общеклинических исследований (общий анализ крови и мочи), биохимические исследования (определение креатинина, мочевины), исследование количества Ат. к БМК при основополагающих клинко-инструментальных и гистологических данных. В процессе комплексного клинко-инструментального и лабораторного анализа показателей пациента и последующего подтверждения ему диагноза СГ необходимо, чтобы скрининговый алгоритм включал в себя лабораторные исследования основных исходных показателей клеточного и гуморального иммунитета (определение количества IgG, М, А, Е). При этом в клеточном звене иммунитета необходимо оценивать наличие рецепторов CD20+ не только на В-лимфоцитах, но и на основных звеньях иммунокомпетентных клеток (Т-лимфоцитах — хелперах, цитотоксических, НКТ-лимфо-

цитах и NK-лимфоцитах), провести определение исходной концентрации провосполительных маркеров: СРБ, ИЛ-6, прокальцитонина, пресепсина. В процессе терапии больных с СГ основное значение играет тщательно спланированный лабораторный мониторинг. Он включает в себя контроль за количеством Ат. к БМП, который должен проводиться не реже одного раза в две недели. Перед иммуносупрессивной терапией в рамках скрининговой диагностики проводится исследование основных иммунных показателей клеточного и гуморального звеньев с последующим контролем количества клеток В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов, NK-лимфоцитов для оценки степени иммуносупрессивной терапии и контроля за развитием вторичного иммунодефицитного состояния. Рецепторы CD20⁺ в основном находились на В-лимфоцитах, но описаны случаи их нахождения на других популяциях, например, на Т-хелперах и NK-лимфоцитах. Поэтому перед началом иммуносупрессивной терапии необходимо получить исходное состояние клеточного звена иммунитета пациента и оценить степень экспрессии CD20⁺-рецепторов на разных типах иммунокомпетентных клеток, чтобы после терапии избежать тотального иммунодефицита. По результатам наших исследований, процентное содержание В-лимфоцитов снижалось менее 1% и даже до неопределяемого уровня при норме от 8 до 19%, что приводило к снижению уровня продукции как Ат. к БМК, так и всех классов иммуноглобулинов и требовало проведения заместительной иммуноглобулинами разных классов. В процессе терапии Ретуксимабом оценку клеточного и гуморального звеньев в ближайшем периоде (в среднем 2–3 месяца) осуществляли по следующей схеме до проведения, после каждого курса и в течение 3–5 дней после последнего курса Ретуксимаба и каждые две недели в течение 3–4 месяцев нахождения больного в стационаре. В исследовании гуморального иммунитета по описанной выше схеме включали исследования воспалительных маркеров — СРБ, ИЛ-6, прокальцитонина, пресепсина, а в некоторых случаях по клиническим показаниям эти исследования проводили и чаще. В случаях развития синдрома системной воспалительной реакции дополняли исследование методиками по определению липополисахарида, для чего использовали ЛАЛ-тест. Другие исследования, которые входили в комплексное исследование у данных пациентов, являлись сопроводительными исследованиями показателей биохимии крови, кислотно-щелочного состояния организма, содержания лейкоцитов, эритроцитов и гемоглобина в крови. Периодичность может быть индивидуальной: от одного раза в неделю до нескольких раз в день в зависимости от тяжести состояния. С учетом того, что данное заболевание имеет неблагоприятные исходы, стоит отметить, что выжившие, в отличие от погибших пациентов, в комплексной терапии получали препарат Ретуксимаб (Мабтера), им всем проводился постоянный лабораторный мониторинг состояния иммунной системы для контроля за лечением и иммунокоррекцией, и они требовали постоянного наблюдения. Основным специфическим лабораторным показателем для постановки диагноза пока остается количество аутоантител к базальной мембране клубочков почек и данные гистологии биопсийного материала почек. Диспансерная схема лабораторной диагностики должна включать исследование иммунограммы с мониторингом основных классов иммунокомпетентных клеток

не реже одного раза в 2–3 месяца и определение количества иммуноглобулинов А, М, G не реже раза в месяц для своевременной заместительной терапии.

Выводы. В процессе оценки и анализа данных клинических случаев в лабораторном центре были сформированы два алгоритма лабораторных исследований пациентов с подозрением на СГ: скрининговый и мониторинговый. Данная патология, безусловно, нуждается в дальнейшем наблюдении и изучении, однако имеющиеся у нас наработки по объему и периодичности исследований могут быть полезны специалистам как лабораторных, так и клинических специальностей в терапии синдрома Гудпасчера.

Скрининг хронической болезни почек в амбулаторно-поликлинических учреждениях. Требования аналитического качества при исследовании мочи

С. А. Картавенков, Л. Ф. Еремеева

«Фрезениус Медикал Кеа Кубань», централизованная лаборатория, г. Краснодар

Screening for chronic kidney disease in clinics. Requirements for analytical quality on urine testing

S. A. Kartavenkov, L. F. Eremeeva

The centralized laboratory 'Fresenius Medical Care Kuban', Krasnodar, Russia

На нынешний день в России нет эпидемиологических исследований, которые позволяли бы оценить когортную распространенность хронической болезни почек. Предполагаемая высокая частота выявления отдельных маркеров поражения почек обуславливает необходимость широкого внедрения специализированных скрининговых программ.

Целью работы является оценка аналитических качеств различных методических подходов выявления мочевого синдрома и протеинурии при первичном скрининговом исследовании мочи среди амбулаторных пациентов без заболеваний мочевыделительной системы в анамнезе.

Материалы и методы. Проведен анализ выявления микропротеинурии и мочевого синдрома в четырех амбулаторно-поликлинических учреждениях города Краснодара — 5461 наблюдение. Все пациенты впервые обращались за амбулаторной помощью в данное учреждение. Медиана возраста составила 50 лет (минимум 16, максимум 94). Женщины преобладали: 66,6% против 33,4% мужчин. Все пробы мочи пациентов попадали в одну из двух категорий: «первая утренняя» или «вторая утренняя». Принципиальных различий типу пробы в нашем исследовании не придавалось, так как для широких скрининговых мероприятий никогда не удастся получить один из этих типов образца у всех пациентов. Белок в моче определяли тремя различными методами: количественным фотометрическим с красителем пирогалловым красным Protein (urine) (Испания), визуально с использованием индикаторных полосок для качественного определения «Урибел» (Россия), автоматической отражательной фотометрией многофункциональных тест-полосок URiSCAN 11 strip (Корея). О наличии (отсутствии) мочевого синдрома первично судили по зонам многофункциональных тест-полосок «кровь», «лейкоциты», «нитриты», а в дальнейшем на основании микроскопического исследования нативного мочевого осадка.

Число (+) проб, ПГК	Число ложно (-) проб	% ложно (-) результатов	Среднее белка в ложно (-) пробах, г/л	Ме белка в ложно (-) пробах, г/л	Min белка в ложно (-) пробах, г/л	Max белка в ложно (-) пробах, г/л
Визуальный учет результатов тест-полосок на белок						
353	150	42,5	0,19	1,15	0,11	1,35
Автоматический анализатор мочи, многофункциональные тест-полоски						
353	132	37,4	0,21	0,15	0,11	1,68
Визуальный учет и автоматический анализатор мочи						
353	102	28,9	0,17	0,14	0,11	1,16

Частота выявления протеинурии при использовании классических методов «сухой химии» с красителем бромфеноловым синим, реализованном в большинстве тест-полосок для мочи, всегда ниже, чем при любом другом подходе. Это обусловлено как низкой специфичностью самой реакции, так и низкой чувствительностью за счет тропности индикатора преимущественно к альбуминовой фракции. О достоверной, клинически значимой протеинурии, можно говорить при реакции тест-полоски не менее 3+, что примерно соответствует 1,0 г/л белка. В таком случае чувствительность метода будет составлять 96%, а специфичность 87% (В. В. Вельков, 2007). Аналитические характеристики зоны тест-полосок «кровь» при реакции 1+ составляют: чувствительность 91–100%, специфичность 65–99% в зависимости от клинической ситуации и нозологической формы заболевания. Возникает противоречие: критерий «протеинурия / микропротеинурия», имеющий огромное значение для диагностики хронической болезни почек, исследуется методами, не позволяющими определять незначительную, а зачастую и высокую потерю белка. При использовании тест-полосок любых производителей частота ложно-отрицательных результатов составляет около 30% от образцов с положительным результатом фотометрического определения.

Выводы. Предварительно рассчитанная частота выявления при количественном первичном скрининге протеинурии для популяции г. Краснодара составляет 6,46%. Исследование белка в моче с помощью тест-полосок в диапазонах незначительной и высокой протеинурии имеет очень сомнительную ценность в диагностике хронической болезни почек. В настоящее время единственным доступным и точным методом определения протеинурии является фотометрия с порогогалловым красным. Аналитические характеристики тест-полосок для выявления мочевого синдрома по критериям «гематурия», «лейкоцитуррия», «бактериурия» в широкой популяции являются приемлемыми для первичного лабораторного скрининга хронической болезни почек.

Метод определения функционального состояния митохондрий в организме у человека по показателям активности ферментов и микроскопического вида лимфоцитов крови на мазке (цитобиохимический метод)

М. Н. Кондрашова¹, Н. В. Хундерякова¹, М. В. Захарченко¹, Т. В. Ячкула¹, С. А. Плясунова², В. С. Сухоруков³, Н. И. Косякова⁴, Е. Г. Литвинова¹, Н. И. Федотчева¹, П. М. Шварцбурд¹

¹ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН, г. Пушкино, Московская область; ²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, г. Москва; ³ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва ⁴ФГБУЗ «Больница Пушкинского научного центра РАН», г. Пушкино, Московская область

Method for determining functional state of mitochondria in human by activity of enzymes and microscopic appearance of blood lymphocytes in smear (cytobiochemical assay)

M. N. Kondrashova¹, N. V. Khunderyakova¹, M. V. Zakharchenko¹, T. V. Yachkula¹, S. A. Plyasunova², V. S. Sukhorukov³, N. I. Kosyakova⁴, N. I. Fedotcheva¹, E. G. Litvinova¹, P. M. Schwartzburd¹

¹The Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino; ²The Federal Research and Clinical Centre for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. Dmitry Rogachev, Moscow; ³The Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov, Moscow; ⁴Hospital of Pushchinsky Scientific Center of the RAS, Pushchino; Russia

Работа относится к актуальному направлению современной персонализированной медицины — поиску биомаркеров состояния митохондрий в организме человека. Эта задача востребована, так как уже принято, что состояние митохондрий определяет состояние клеток и организма. Однако традиционный биохимический метод выделения кусочка ткани и его разрушение на первом же этапе сильно повреждает основную систему регуляции митохондрий в организме — их объединение в единую сеть. Наш подход, основанный на объединении положительных сторон цитохимического и биохимического метода с усовершенствованиями позволяет сохранить состояние исследуемых *in vitro* митохондрий, близким к нативному в организме, и выявляет функциональные изменения с амплитудой в 2–3 раза и более сравнительно с разницей в процентах, обнаруживаемой другими методами. Метод описан в патенте и публикациях.

Цель и задачи исследования. Сообщение имеет целью познакомить врачей, проводящих клинические исследования, с новыми результатами, полученными цитобиохимическим (ЦБХ) методом в последнее время. Рассмотрены изменения, выявляемые при тяжелых патологиях. Рассмотрены также менее выраженные, но четко выявляемые изменения состояния митохондрий, особенно у пожилых, в пределах нормы или хронической патологии, которые также очень важны, так как позволяют перейти от лечения к защите индивидуального здоровья.

Материалы и методы. Проведено исследование ЦБХ методом активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), при действии регулятора СДГ изолимонной кислоты (ИЗЛ), α-кетоглутаратдегидрогеназы (КДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Проведен предложенный авторами расчет

показателя, характерного для раковой клетки, показывающего отношение гликолиза к дыханию Эффекта Варбурга (ЭФВ) по отношению активности ЛДГ к СДГ. Описано изменение микроскопического вида лимфоцитов при инкубации с перечисленными метаболитами — субстратами окисления. Важным преимуществом метода является высокая статистическая достоверность, даже единичного определения. Это обусловлено тем, что полученный результат основывается на обчете 50–100 клеток в мазке, что дает высокую статистическую достоверность каждого полученного значения (99,9%; $p < 0,001$).

Результаты. 1) Выявление больших различий при лейкозах и миопатиях у больных детей по сравнению со здоровыми. Исследованы дети, больные лейкозами в возрасте от 2 до 15 лет, $n = 25$, группами по 5–7 человек, сравнительно со здоровыми сходного возраста, числом от 1–3 и до пяти для каждой группы одновременно или в близкие календарные сроки. Для лейкозов характерно сильное повышение активности ЛДГ по сравнению с контролем, а для миопатий, наоборот, снижение. Активность СДГ меняется противоположно. В результате отношение ЛДГ/СДГ меняется очень сильно. Кроме изменений активности ферментов у детей с лейкозами обнаружено сильное изменение вида лимфоцитов и количества моноцитов при инкубации клеток в течение часа для развития окраски с разными метаболитами — субстратами окисления. Такие измененные клетки не появляются во время инкубации мазков, взятых у здоровых. Поэтому мы называем их патологическими. Изменения активности выражены различно в субпопуляциях патологических и нормального вида клеток при лейкозах. Особенно сильны отличия в патологических клетках. При лейкозе у детей 3–5 лет в патологических клетках наблюдаются высокие величины ЭФВ — 26–55. Контроль для этого возраста выше, чем у более старших детей, и равен 14. При лейкозе возраста 5–15 лет ЭФВ 12,6–24,0 в контроле 11,6. В популяции ЛФ нормального вида у всех детей при лейкозе ЭФВ ниже, чем у здоровых: 5,6–9,9. У детей с миопатиями возраста 4–11 лет наблюдается уменьшение показателя ниже нормы: 4, 5 и меньше единицы. 2) Выявление малых, но четко выраженных отличий при разных состояниях в пределах нормы и у хронических больных астмой. Сравнение пожилых и людей среднего возраста. При обследовании пожилых людей, $n = 7$, возрастом от 51 до 79 лет выясняется вопрос сохранности уровня их здоровья при отсутствии выраженных клинических проявлений. В отличие от тяжелой патологии, отмечаются минорные персональные различия по активности СДГ, ЛДГ и ЭФВ. Они гораздо сильнее проявляются по активности КДГ, которая ниже у пожилого, и по влиянию КГЛ на окраску ядра нейтральным красным, которое, напротив, выше у пожилого. Оказалось, что персональные различия в пределах нормы хорошо выявляются по виду лимфоцитов после развития окраски при добавлении субстратов. Лимфоциты обследуемого среднего возраста более распластаны, бледнее окрашены. У пожилого они более сокращены и интенсивнее окрашены. Первое состояние соответствует более полному покою, а второе свидетельствует о некотором возбуждении. Было проведено ЦБХ-исследование

у больных астмой в разные сезоны. При исследовании лимфоцитов пожилых больных многолетней хронической астмой, принимающих длительное время различные препараты, обнаружено различие весенне-летнего перехода у больных, принимающих серетид в период марта–июня. По величине ЭФВ больные группы из пяти человек могут быть строго расположены в порядке от лучшего состояния к более тяжелому. Это расположение полностью совпадает с заключением о тяжести состояния по клиническим данным. 3) Сопоставление ЦБХ анализа со значениями интегральных лейкоцитарных индексов (ИЛИ). В исследовании принимали участие группы обследуемых здоровых ($n = 6$, возраст от 3 до 16 лет) и больных лейкозами ($n = 6$, возраст от 3 до 15 лет) детей с разной степенью тяжести заболевания. ИЛИ, представляющие собой определенные сочетания показателей лейкограммы, сопоставляли с показателями активности ЛДГ и СДГ. Наиболее информативными оказались индексы, относящиеся к группе индексов интоксикации (ИИ). Анализ ИЛИ показал четкое разделение пациентов на две подгруппы: с показателями, значительно (в пять и более раз, реактивный ответ нейтрофилов, РОН — в 70 раз) или умеренно (в среднем в два раза) повышенными относительно контроля. Причем во второй подгруппе только два показателя отличались от контроля: РОН и лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИк). Высокие значения ИЛИ соответствовали более тяжелому состоянию пациентов, которое оценивалось по выпискам из историй болезней. Так для ЛИИк показатели были следующие: $0,17 \pm 0,08$; $5,48 \pm 0,28$; $0,42 \pm 0,07$ (в контроле, первой и второй подгруппах соответственно). Такое же разделение на подгруппы (с тем же составом пациентов, как по показателю ИЛИ) выявилось при анализе активностей дегидрогеназ. В лимфоцитах, не отличающихся по виду от контрольных, значения активности ЛДГ у всех пациентов были ниже, чем у здорового ($11,0$; $4,5 \pm 0,7$; $6,7 \pm 0,9$ — в контроле, первой и второй подгруппах соответственно). В подгруппе лейкоза с большей степенью тяжести состояния активность ЛДГ была ниже, чем в подгруппе с меньшей тяжестью состояния. То есть наблюдалась обратная корреляция активности ЛДГ со значениями ИЛИ и с тяжестью общего состояния пациентов. В патологических клетках (не наблюдавшихся в контроле) активность ЛДГ была выше, чем в нормальных лимфоцитах и составляла (в у.е.) $7,1 \pm 1,5$ в первой подгруппе пациентов и $17,3 \pm 2,6$ во второй. Таким образом, в патологических клетках более высокая активность ЛДГ также наблюдалась в подгруппе пациентов с меньшей степенью тяжести состояния (и с умеренным повышением показателей ИЛИ относительно контроля).

Выводы. Впервые показана высокая информативность определения состояния митохондрий в организме на мазках крови в условиях авторского ЦБХ метода для суждения о тяжести заболевания. Представлены исследования на примере лейкоза и миопатии у детей, а также различий состояния уровня здоровья в пожилом возрасте и у пожилых больных с хронической астмой. Метод доступен экспериментально для использования в клинике, так как основан на микроскопировании мазков крови в определенных условиях. В настоящее время

приоритета автоматических методов анализа мы привлекаем внимание к удобству использования и визуального наблюдения лимфоцитов после воздействия метаболитов, которое проводится микроскопистом в качестве первого этапа выбора клеток для компьютерной обработки, однако игнорируется как самостоятельный ценный показатель. Основную трудность для внедрения этого ценного метода в практику медицины и здравоохранения представляет освоение новой области знания о регуляции процессов в митохондриях и ее связи с состоянием в организме. Эти сведения трудно извлекать из литературы самостоятельно. Предшествующие статьи этой группы помогают освоить новые данные. Авторы могут участвовать в обучении посредством программ в интернете.

Использование прямых маркеров фиброза печени в диагностике неалкогольной жировой болезни печени у военнослужащих контрактной службы

Е. В. Крюков¹, С. П. Казаков^{1,3}, В. А. Семисерин², А. Г. Каракозов², О. Б. Левченко², А. И. Молодова², С. Ю. Леонова²

¹ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н. Н. Бурденко» Минобороны России, ²КДП ФГБУ «9-й лечебно-диагностический центр» Минобороны России, ³ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России; г. Москва

Using direct liver fibrosis markers in diagnostic non-alcoholic fat disease in contract military servicemen

E. V. Kryukov¹, S. P. Kazakov^{1,3}, V. A. Semeserin², A. G. Karakozov², O. B. Levchenko², A. I. Molodova², S. Y. Leonova²

¹The Main Military Clinical Hospital n.a. N. N. Burdenko; ²the 9th Diagnostic and Treatment Centre; ³the Russian Medical Academy for Postgraduate Education; Moscow, Russia

Цель исследования. Провести комплексное клинико-инструментальное и лабораторное исследование военнослужащих контрактной службы для ранней диагностики начальных стадий фиброза печени.

Материалы и методы. На базе консультативно-диагностической поликлиники ФГБУ «9-й Лечебно-диагностический центр» Минобороны РФ с 2014 года по настоящее время проводится научно-практическая работа по раннему выявлению начальных стадий фиброза печени у военнослужащих контрактной службы. В исследование включены военнослужащие (лица мужского пола) в возрасте от 23–48 лет, у которых диагностировано конституциональное ожирение 1–2 степеней. Критерии включения: 1. возраст от 23 лет и более; 2. имеющие в анамнезе диагностированное конституциональное ожирение 1–2 степеней; 3. имеющие ИМТ < 30. Критерии исключения: 1. ИМТ ≥ 30; 2. пациенты с вирусной этиологией гепатита (положительные Hbs-Ag; анти-HCV; ДНК HBV; РНК HCV); 3. пациенты с аутоиммунным гепатитом; 4. холедохолитиаз; 5. декомпенсированная патология сердечно-сосудистой системы, органов дыхания, печени, почек; 6. ургентная патология органов брюшной полости.

Исследование вирусной нагрузки, маркеров фиброза, расчеты диагностической эффективности маркеров с оценкой порогового значения, чувствительности и специфичности проводили на базе ЦКЛД ГВКГ имени Н. Н. Бурденко.

Результаты и обсуждения. Фиброз печени — это патологическое разрастание соединительной ткани без изменения структуры органа. Его течение отличается от цирроза тем, что печеночные дольки не подвергаются структурным изменениям и продолжают функционировать. Фиброзная ткань разрастается вокруг них, что может привести к деформации органа и нарушениям его нормальной работы. Различают инвазивные, малоинвазивные и неинвазивные методы определения фиброза печени. К инвазивным методам относится пункционная трепанобиопсия. К малоинвазивным методам фиброза печени относятся исследования крови на не прямые и прямые маркеры фиброза. Непрямые маркеры фиброза — это традиционные сывороточные биохимические маркеры — молекулы, высвобождаемые в кровь из-за нарушения обменных процессов в печени: 1. аминотрансферазы (АСТ и АЛТ) и их соотношение (коэффициент Де Ритиса); 2. молекулы синтезируемые, регулируемые или секретируемые печенью: а) аполипопротеин А1; б) альфа-2-макроглобулин (А2М); в) количество тромбоцитов, используется как показатель тяжести фиброза; г) холестерин и билирубин, гаптоглобин; д) гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП). Прямые маркеры фиброза характеризуют метаболизм внеклеточного матрикса (фиброгенез и фибринолиз), изменения в stellatных (звездчатых) клетках, которые доминируют в профиброзных клетках. К прямым маркерам фиброза относятся: а) гиалуроновая кислота; б) проколлагеновые пептиды — N-терминальный пептид проколлагена III; в) коллагены IV и VI, матриксные металлопротеиназы; г) TIMP-I; д) YKL-40; е) ламинин и пепсин-резистентный фрагмент ламинина. К неинвазивным методам относится ультразвуковое исследование печени, а также эластография — метод, который позволяет провести оценку тканевой эластичности органов и тканей. В связи с тем, что существуют ряд противопоказаний к проведению пункционной биопсии печени, а также боязнь и отказ пациента от исследования, не находит массового распространения и применения в клинической практике. В то же время малоинвазивный и неинвазивный методы находят гораздо большее применение и распространение в клинической практике. По данным отечественной и зарубежной литературы, прямые маркеры фиброза печени являются более чувствительными и специфичными для диагностики ранней стадии фиброза печени. В исследовании были включены две группы военнослужащих: опытная (47 человек) и контрольная (53 человека), проходящие плановое углубленное медицинское обследование. Пункционная биопсия печени не выполнялась, так как плановое углубленное медицинское обследование проводилось только амбулаторно. У военнослужащих опытной группы дополнительно определялись прямые маркеры фиброза печени для получения более ранней информации о наличии функциональных расстройств печени. Анализ полученных результатов показал, что у военнослужащих опытной группы функциональные расстройства печени (начальные проявления фиброза), по данным прямых маркеров, выявлялись в более раннем периоде. Данные исследования подтверждались и мониторировались по результатам эластографии печени как в контрольной, так и в опытной группах. При этом патологические изменения биохимических не прямых маркеров наступали в более позднем периоде обследования

в отличие от военнослужащих опытной группы, у которых лабораторные показатели прямых маркеров фиброза печени начинали повышаться значительно раньше до повышения не прямых маркеров печени. Результаты оценки диагностической эффективности исследования прямых и не прямых маркеров печени в двух группах показывают, что использование прямых маркеров в диагностике фиброза печени обладает большей диагностической эффективностью: чувствительность достигала 78–89% в зависимости от маркера при специфичности в 95%. Отмечались значительно более высокие показатели AUC при исследовании прямых маркеров печени в пределах 0,82 до 0,89.

Выводы. Использование прямых маркеров фиброза печени в клинической практике позволяет выявлять фиброз печени на ранних стадиях функциональных нарушений. Использование прямых маркеров в диагностике фиброза печени у военнослужащих контрактной службы позволяет с меньшими экономическими затратами получить достоверные результаты начальных проявлений заболевания, и не требуется наличия редкой и дорогостоящей аппаратуры (УЗИ и фиброскан) и квалифицированных специалистов. Проводимые исследования прямых маркеров целесообразно организовать в рамках одного специализированного лабораторного подразделения и централизовать эти исследования для нескольких лечебно-профилактических учреждений.

Сравнительная оценка слайд-планшетов и камеры Горяева при подсчете форменных элементов

С. В. Кулешова, Л. О. Минушкина

ФГБУ «Поликлиника № 2» Управления делами Президента РФ, г. Москва

Comparative evaluation of slides kits and Goryaev's camera in calculating formed elements

S. V. Kuleshova, L. O. Minushkina

Polyclinic № 2 of the Administrative Department of the President of Russia, Moscow, Russia

Анализируя в течение полугода результаты пациентов, полученные в нашей лаборатории с данными этих же пациентов, полученными в других лечебных учреждениях, мы выяснили, что в ряде случаев имеются завышенные результаты анализа при использовании слайд-планшетов при отсутствии клинических проявлений болезни, функциональных изменений и при нормальных значениях анализов в нашей лаборатории. Перед вводом в работу пластиковых слайд-планшетов мы решили провести исследование, целью которого было оценить воспроизводимость результатов подсчета с помощью камеры Горяева и нового пластикового слайд-планшета.

Материал и методы исследования. В качестве материала для исследования были взяты образцы крови 16 больных. Проводился подсчет количества лейкоцитов. В качестве контрольного измерения использовались данные автоматического гематологического анализатора Сисмекс КХ-21N. Подсчет также велся тремя независимыми врачами, которые определяли количество лейкоцитов с помощью камеры Горяева и слайд-планшета.

Камера Горяева предназначена для подсчета форменных элементов крови и клеточных элементов спинномозговой жидкости, ТУ9443–007–29508133–2007, РУ МЗ № ФСР 2008/02731 от 11.06.2008. Технические данные камеры: площадь 9 мм², глубина 0,1 мм, объем 0,9 мм³. Камера (слайд-планшет) для микроскопического исследования осадка мочи и других биологических жидкостей, Aptaca. Каждая ячейка снабжена сеткой для подсчета (3 × 3 мм) и покрыта тонкой прозрачной пластиковой пластинкой, играющей роль покровного стекла. Каждая сетка поделена на пять квадратов (1 × 1 мм), которые, в свою очередь, разделены на девять маленьких квадратов (0,333 × 0,333 мм). Изготовлена камера из полиметилметакрилата (ПММА). Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2011/09223 от 19 марта 2012 года. Подсчет велся согласно инструкции, опубликованной на сайте производителя [5]. Для исследования мы брали образцы венозной крови, определяя количество лейкоцитов с помощью автоматического гематологического анализатора «Сисмекс КХ-21N» (Sysmex КХ-21N) Производитель: Roche Diagnostics (Швейцария).

Результаты исследования. Проанализировано 16 проб. Подсчет велся независимо тремя врачами высшей категории. Средние значения количества лейкоцитов по данным анализатора составили $5950 \pm 2407 \times 10^9/\text{л}$ ($M \pm SD$), при подсчете с помощью камеры Горяева (средние данные трех независимых врачей) $4916 \pm 1794,4 \times 10^9/\text{л}$, с помощью слайд планшета (средние данные трех независимых врачей) $9477 \pm 3624 \times 10^9/\text{л}$. Полученные данные достоверно отличались от результатов автоматического гематологического анализатора. У двух врачей результаты подсчета с помощью камеры Горяева и автоматического анализатора достоверно не отличались, но существенно отличались от значений, полученных при работе со слайд-планшетом. Обращает на себя внимание, что при подсчете с помощью слайд-планшета были выше не только собственно средние значения количества форменных элементов крови, но и дисперсия полученных результатов, оказавшаяся достоверно большей, чем дисперсия результатов автоматического анализатора. Наименьшая дисперсия значений количества форменных элементов наблюдалась при использовании камеры Горяева.

Обсуждение результатов. Проведенное нами исследование показало существенные расхождения в подсчете количества форменных элементов крови с помощью различного лабораторного оборудования. Ранее мы, проводя подсчет в камере клеточных элементов для анализа мочи по Нечипоренко с помощью слайд-планшета, получали результаты, которые не укладывались в референсные значения. В литературе найти описание нашей проблемы или ее решение нам не удалось. Следует также отметить, что имелись существенные разночтения между официальной инструкцией на русском языке, и инструкцией, полученной непосредственно от производителя. Мы в работе ориентировались на инструкцию, предоставленную производителем оборудования. Для собственного исследования мы выбрали подсчет форменных элементов крови, а не мочи в связи с тем, что имели автоматизированный способ контроля их количества. Следует отметить, что подсчет форменных элементов в камере Горяева оказался более точным. У двух врачей из трех результаты измерений достоверно не отлича-

лись от данных автоматического анализатора. Полученные данные при использовании слайд-планшета у всех трех врачей существенно отличались как от данных анализатора, так и от данных традиционного подсчета с помощью камеры Горяева. Работа с камерой Горяева позволяет получить меньший разброс результатов, чем работа со слайд-планшетом. Таким образом, при переходе к иному методу подсчета (например, при замене камеры Горяева на слайд-планшет для выполнения анализа по методу Нечипоренко) использование существующих референтных значений вряд ли допустимо. При работе с другим материалом, заменяя камеру Горяева на слайд-планшет, необходимо предварительно проверить возможность использования существующих норм. Результаты, полученные при работе со слайд-планшетами часто оказываются выше, чем при использовании других методов. На бланке с результатом следует указывать прибор, использованный в работе: камера Горяева или пластиковый слайд-планшет. Это важно для корректного сравнения результатов. Также необходимо учесть, что инструкция, прилагаемая к слайд-планшетам, не приводит полный объем информации для безопасного использования. В случае подсчета клеток по методу Нечипоренко нельзя пользоваться предложенной формулой в инструкции без применения коэффициента концентрации. Данные по коэффициенту приводятся в полной версии инструкции производителя либо высчитываются самостоятельно.

Взаимосвязь С-реактивного белка и гомоцистеина у здорового населения Пензенской области

Е. Р. Кулюцина, Т. А. Дружинина, Е. В. Кривченкова

ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Минздрава России, г. Пенза

The relationship of C-reactive protein and homocysteine in a healthy population of the Penza

E. R. Kulyutsina, T. A. Druzhinina, E. V. Krivchenkova

The Penza Institute for Postgraduate Study of Doctors, Penza, Russia

Цель исследования — выявить взаимосвязь уровня высокочувствительного С-реактивного белка (вчСРБ) и гомоцистеина (ГЦ) у здорового населения Пензенской области в различных возрастных и гендерных группах.

Материалы и методы. В качестве модели здорового населения Пензенской области были обследованы доноры Пензенской областной станции переливания крови, 271 человек (152 мужчин и 119 женщин). Из них были выделены шесть групп: мужчины и женщины по возрастам 18–31, 32–45, 46–60 лет. В исследование были включены доноры крови и плазмы (доноры плазмы включались в исследование после месячного отдыха после предыдущей донации). Все обследуемые подписывали протокол информированного согласия на участие в исследовании. Клинико-лабораторное обследование доноров было осуществлено в рамках проекта «Алгоритмы и программное обеспечение медицинской информационно-аналитической системы в области гематологии», поддержанного грантом ФГБУ «Российский фонд фундаментальных исследований» (номер проекта 12–07–97009/12-р_поволжье_a). Выполнялось определение концентрации ГЦ

иммунохемилюминесцентным и вчСРБ-иммуноферментным методами. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. Уровень показателей ГЦ и вчСРБ представлен медианой и интерквартильным размахом (Ме [25%; 75 %]). Корреляционный анализ проводился по критерию Спирмена. Достоверность различий между группами оценивали непараметрическим U-критерием Манна-Уитни.

Результаты. У мужчин наиболее высокие значения вчСРБ (5,8 [2,8; 9,4] мг/л) наблюдали в старшей возрастной группе (46–60 лет). Наоборот, наиболее высокий статистически значимый уровень ГЦ (12,97 [10,12; 18,67] мкмоль/л) был выявлен у мужчин молодого возраста (18–31 года). У женщин наиболее высокие значения вчСРБ (7,45 [3,6; 11,4] мг/л) зарегистрированы в другой возрастной группе 32–45 лет. Значения ГЦ, напротив, были статистически более высокими (12,62 [9,23; 15,8] мкмоль/л) в старшей возрастной группе (46–60 лет). Проведение анализа взаимосвязи уровней вчСРБ и ГЦ во всех возрастных и гендерных группах, а также у всех обследуемых мужчин и женщин вне зависимости от возраста ни в одном случае не выявило наличия достоверных корреляционных связей.

Выводы. Выявлено отсутствие взаимосвязи показателей уровня вчСРБ и ГЦ в различных возрастных группах здоровых мужчин и женщин Пензенской области. Полученные данные уровня как ГЦ, так и вчСРБ, отражающих разные механизмы развития эндотелиальной дисфункции, свидетельствуют, что у здоровых людей они имеют различную диагностическую значимость как предикторы ССЗ. Это требует дальнейшего изучения влияния факторов, под воздействием которых они изменяются и реализуют свою патогенетическую роль в развитии ССЗ в различных гендерных и возрастных группах для организации персонализированных программ профилактики в данном конкретном регионе.

Метод лабораторной диагностики хронического генерализованного пародонтита по элементному составу ротовой жидкости

Т. К. Ларионова, А. Ш. Галикеева

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России; г. Уфа

Method of laboratory diagnostics of chronic generalized periodontitis by elemental composition of oral liquid

T. K. Larionova, A. Sh. Galikayeva

The Ufa Research Institute for Occupational Medicine and Human Ecology; Bashkirian State Medical University; Ufa, Russia

Вопросы диагностики болезней пародонта остаются одной из актуальных проблем современной стоматологии. Хронический генерализованный пародонтит (ХГП) развивается под действием различных факторов, среди которых значительное место занимает нарушение минерального обмена, в том числе дефицит в организме жизненно важных элементов, таких как кальций и магний. Содержание кальция и магния в крови имеет обратную зависимость: низкие уровни магния вызывают гиперкальциемию. В силу антагонистических отношений накопление в ор-

ганизме токсичного микроэлемента кадмия приводит к замещению кальция и магния и, как следствие, патологическим нарушениям в костной ткани и остеопорозу.

Цель настоящего исследования: разработка способа диагностики степени тяжести генерализованного пародонтита по соотношению химических элементов кальция, магния и кадмия в ротовой жидкости.

Материалы и методы. Проведено комплексное стоматологическое обследование (анкетирование, выявление жалоб, сбор анамнеза, визуальный и инструментальный осмотр полости рта 160 человек в возрасте 23–60 лет (75 мужчин и 85 женщин). Для оценки минерального статуса методом атомно-абсорбционной спектроскопии изучено содержание Ca, Mg, и Cd в ротовой жидкости пациентов. Математический анализ и статистическую обработку полученных данных с предварительной проверкой законов распределения исследуемых переменных на нормальность по критериям Шапиро-Уилка и Эппса-Палли проводили с использованием стандартных компьютерных программ.

Результаты. Клинический осмотр пациентов выявил патологию пародонта у 100 % обследованных. Из них у 6,1 % пациентов был поставлен диагноз «хронический катаральный гингивит», у 25,3 % «ХГП легкой степени тяжести», у 34,7 % пациентов «пародонтит средней степени» и у 33,9 % «пародонтит тяжелой степени». Все пациенты были распределены на три группы по степени тяжести заболевания. Был рассчитан коэффициент соотношения кальция и магния ($K = Ca/Mg$) в ротовой жидкости. При $K \leq 4,7$ содержание кадмия в слюне соответствовало минимальному его значению (менее 0,1 мкг/л), клинически у этой группы больных диагностировали гингивит и ХГП легкой степени тяжести. Во второй группе у пациентов с диагнозом ХГП средней степени тяжести $K = 4,8–8,3$; при этом содержание кадмия в ротовой жидкости составляло 0,32–0,61 мкг/л. У пациентов третьей группы с тяжелой степенью ХГП $K \geq 8,4$. В ротовой жидкости отмечалось увеличение содержания кадмия в слюне более 0,61 мкг/л.

Выводы. 1) Установлена взаимосвязь содержания кадмия в биологических средах организма с патологическими изменениями в пародонте. 2) Коэффициент соотношения Ca/Mg может являться одним из критериев ранней диагностики патологических изменений в костной ткани и маркером воздействия токсичного элемента кадмия на организм человека.

Универсальные молекулярные лектиновые системы эритропоэтина человека: общие закономерности распознавания гликоконъюгатов белками

В. М. Лахтин, М. В. Лахтин, В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев
ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, г. Москва

Universal molecular lectin systems of human erythropoietins: general properties of glycoconjugate recognition by proteins
V. M. Lakhin, M. V. Lakhin, V. A. Alyoshkin, S. S. Afanasiev
The Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology n.a. G. N. Gabrichevsky, Moscow, Russia

В гликопротеиновых цитокинах человека с измененным ландшафтом поверхности молекул (особенно в случаях

экспрессии в бактериальных системах, при обработках эндогликозидазами; в условиях ограниченного протеолиза) в области экспонированных участков потенциального Asn- и Ser/Thr-гликозилирования возможно сохранение или имитация внешне доступных конформационных «пустот», способных аккомодироваться для адекватного комплементарного связывания гликанов и гликоконъюгатов (ГК). Это позволяет цитокину проявлять дополнительные новые биологические и физиологические активности — лектиновые, поддерживающие и адаптирующие выполнение основных функций.

Цель: обобщить собственные результаты изучения белково-гормональных лектиновых систем (ЛС) на примере терапевтически значимого гормона — рекомбинантного эритропоэтина человека (рчЭПО).

Материалы и методы. Исследовали рекомбинантные коммерческие системные препараты рчЭПО: эритроцитина (дегликозилированного, экспрессированного в бактериальной системе), эпокрина (гликозилированного, экспрессированного в клетках CHO), зарубежных аналогов. Системы разделяли изоэлектрофокусированием в пластине полиакриламидного геля в присутствии мочевины и сахарозы с последующим электроблоттингом на гидрофобную мембрану и хемилюминесцентным проявлением иммунным и (в процедурах «доокрашивания») (или) гликоконъюгатным биотин-стрептавидиновым «сэндвичем», меченым пероксидазой. Свечение регистрировали в присутствии хемилюминесцентного субстрата пероксидазы в режиме живого изображения (реального времени) в системе BioChem System (UVP) в оптимизированных режимах. Использовали меченые биотином синтетические полимерные ГК (www.lectinity.com).

Результаты. На примере ЛС высокоочищенных препаратов рчЭПО, взаимодействующих с моноклональными антителами (МАТ) и (или) ГК в направленных надмолекулярных сборках, видны общие закономерности кофункционирования АТ и ГК в реакциях связывания терапевтическими гликопротеинами. Эритроцитин и в меньшей степени эпокрин взаимодействовали с наборами ГК-мишеней (тип ГК)-зависимым образом, проявляли свойства лектинов со сложной специфичностью к полисахаридам, муцинам и гликоантигенам. В целом на поверхности твердофазных (потенциально — поверхностноклеточных) системных форм терапевтического белка:

- присутствуют различающиеся АТ- и ГК-связывающие участки;
- ГК-связывающих участков значительно больше, чем МАТ-связывающих;
- оба типа связывания (ГК-и МАТ-) позволяют максимально визуализировать и разнообразить белковую систему;
- ГК-связывающие участки отличаются разнообразием мозаичных вариантов комбинаций белковых форм по выраженности сродства к выбранному типу ГК;
- проявляются аддитивность действия наборов ГК, потенциальный синергизм типов ГК в отношении белковой системы, в том числе, например, при последовательном использовании типов ГК;
- АТ- и ГК-связывающие участки характеризуются как частично перекрывающиеся (overlapping);

- выраженность, положение на твердой фазе и экспонированность / доступность этих участков (фиксированных, с частично сохраненной способностью к изменению конформации) зависят от форм гормона (наборов форм в общем пуле) типов ГК;
- такие ГК-связывающие мажорные («внутренние» в наборах rI-форм) формы гормона — ассиметричны (в отличие от мАТ-зависимых форм) по мозаике расположения системы всех rI-форм;
- АТ дают более дискретные картины связывания с ЛС при сравнении с действием ГК;
- ГК выявляют дополнительные формы ЛС (увеличивают общее число форм), усиливают ассиметричность расположения ЛС при сравнении со связыванием мАТ;
- АТ способны к частичному вытеснению связавшихся с ГК, обладающих способностью к более выраженным обратимому взаимодействию и меньшим сродством к белку;
- некоторые ГК (требуется скрининг и отбор) защищают наборы твердофазных сборочных форм белка (ГП-иммунный сэндвич) от разрушения присутствующими в окружении деструктивными ферментами (оксидазами и гидролазами), в том числе при хранении терапевтических препаратов;
- ГК защищают белковую систему в соответствии с несколькими механизмами / уровнями;
- ГК защищают АТ;
- использование ГК-связывания после мАТ-связывания дает максимальную варьирующую визуальную контролируемую информацию диагностико-прогностического значения.

Вывод. рЧЭПО, как ГК-связывающая модель, имеет универсальное применение ко всем терапевтическим белкам, в том числе к эндогенному чЭПО, другим сильно- и слабокислым высокогликозилированным природным ГК (цитокинам, интерлейкинам и прочим гликопротеинам; рекомбинантным, надмолекулярным в составе направленных комплексов и ансамблей).

Взаимосвязь концентрации витамина D и уровня лютеинизирующего гормона (ЛГ) у лиц мужского пола г. Санкт-Петербурга и Ленинградской области

Т. В. Лобачевская¹, Л. А. Хоровская², С. А. Печальнова¹

¹Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной генетики ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, ²клинико-диагностическая лаборатория «Глобус-мед»; г. Санкт-Петербург

Relationship between concentration of vitamin D and level of LH in males of Saint-Petersburg and Leningrad Region

T. V. Lobachevskaya¹, L. A. Khorovskaya², S. A. Pechal'nova¹

¹The First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov; ²Clinical Laboratory 'Globus-Med'; Saint Petersburg, Russia

Введение. Витамин D является уникальным, многосторонним и метаболически активным стероидным гормоном, который достоверно связан с другими эндокринными регуляторами функций мужского организма. Спектр жизненно важных биологических эффектов витамина D чрезвычайно широк, а распространенность его дефицита высока. Кли-

матические условия г. Санкт-Петербурга и Ленинградской области ВОЗ относит к регионам, в которых инсоляция недостаточна для выработки организмом витамина D в физиологических количествах. Именно поэтому компенсация дефицита витамина (гормона) D является важной профилактической и лечебной опцией в рамках антивозрастных терапевтических стратегий, направленных на увеличение продолжительности качественной жизни мужчин.

Цель. Определить наличие взаимосвязи между уровнем витамина 25(OH)D и концентрацией гонадотропных гормонов гипофиза (в данном эксперименте ЛГ) у мужского населения Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

Материалы и методы. В ходе клинического эксперимента были исследованы образцы венозной крови у жителей Санкт-Петербурга и Ленинградской области без острой соматической патологии, не принимающих препараты витамина D. Всего были обследованы 48 человек мужского пола. Возраст составил от 18 до 65 лет. Средний возраст 44 года. Определение содержания витамина 25(OH)D в сыворотке проводили электрохемилюминисцентным методом на анализаторе cobas (Roche, Швейцария). Для статистической обработки результатов исследования использовали пакет программ SPSS версии 11.5. В работе выполнялись методы описательной статистики, оценка нормальности данных по критерию Шапиро-Уилка ($p < 0,05$), а также сравнение выборок при помощи дисперсионного анализа (ANOVA) и непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты. Исходя из концентрации лютеинизирующего гормона (ЛГ) в сыворотке крови, обследуемые были разделены на две группы: с нормальной концентрацией ЛГ ($n = 33$) и пониженным содержанием ЛГ ($n = 15$). Далее проводилось сравнение между этими группами и средней концентрацией витамина 25(OH)D. Сравнение проводилось при помощи дисперсионного анализа (ANOVA) и непараметрического критерия Манна-Уитни. Были получены статистически значимые различия ($p = 0,02 / p = 0,004$). В группе с концентрацией ЛГ ниже референсного интервала уровень витамина 25(OH)D в среднем был выше (медиана = 33,60 нг/мл), чем в группе с нормальным содержанием ЛГ (медиана составила 20,36 нг/мл).

Выводы. В процессе исследования выявлена связь между концентрацией ЛГ и уровнем 25(OH)D, что дает основания для мониторинга уровня стероидных гормонов (в данном случае преимущественно фракций тестостерона) у лиц с низким насыщением витамином D, а также, возможно, профилактическое назначение данного препарата для предупреждения ранней андропавузы.

Лабораторный мониторинг эффективности ранней метаболической реабилитации пациентов с ожогами

А. К. Мартусевич, С. П. Перетягин, А. В. Разумовский, Л. К. Ковалева

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, г. Нижний Новгород; ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Нижний Новгород; ФГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Киров

Laboratory monitoring of early metabolic rehabilitation efficiency at patients with burns

A. K. Martusevich, S. P. Peretyagin, A. V. Razumovsky, L. K. Kovalyova
The Privolzhsky Federal Medical Research Centre, Nizhny Novgorod; Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod; Kirov State Medical Academy, Kirov; Russia

Известно, что термическая травма, провоцирующая развитие ожоговой болезни, индуцирует формирование и прогрессирование метаболических нарушений во всех звеньях обмена веществ. Это предопределяет необходимость наряду с устранением дефектов кожного покрова уделять внимание коррекции последних. В то же время крайне целесообразным является применение различных методов оценки исходного метаболического статуса организма пострадавшего, а также его динамики. При этом спектр интегральных лабораторных маркеров, позволяющих отслеживать направленность сдвигов физико-химических свойств биологических жидкостей, относительно узок.

Цель. Оценить информативность изучения кристаллогенных свойств сыворотки крови в мониторинге эффективности озонотерапии у пациентов с ожоговой болезнью

Материалы и методы. В исследование были включены 30 пациентов с термической травмой, разделенных на две равных по численности группы. Пациенты первой (основной) группы получали стандартное лечение согласно федеральному протоколу ведения ожоговых больных, который дополняли курсом системной озонотерапии. Данный курс, начинаемый с 3–4-х суток послеожогового периода, включал 10 ежедневных процедур внутривенного введения озонированного физиологического раствора (200 мл; концентрация озона 3 000 мкг/л). Пациенты второй группы (группы сравнения) получали лечение исключительно в рамках утвержденного федерального стандарта. До начала и по завершении курса озонотерапии у пациентов производили забор крови с последующим выделением сыворотки. Оценку кристаллогенных свойств последней осуществляли методом тизокристаллоскопии (Мартусевич А. К., Гришина А. А., 2009). В качестве базисного вещества в тизиграфическом тесте использовали 0,9-процентный раствор хлорида натрия. Описание кристаллоскопических и тизиграфических фаций выполняли морфологически и с помощью системы полуколичественных балльных параметров (кристаллизуемость — Кр, индекс структурности — ИС, степень деструкции фации — СДФ, выраженность краевой белковой зоны — Кз и др.). У всех пациентов до начала исследования получали информированное согласие на участие в нем. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли Н-критерий Краскала-Уоллеса.

Результаты. Проведенное сопоставление с ранее полученными нами данными о сдвигах кристаллогенных свойств сыворотки крови, характерных для раннего периода ожоговой болезни, позволило подтвердить однонаправленность результатов. Так, у всех пострадавших в начальной точке наблюдения (на 3–4-е сутки после получения термической травмы)

в образцах дегидратированной сыворотки крови отмечали выраженное угнетение кристаллогенеза, уменьшение линейных размеров и плотности кристаллических элементов со значительным повышением степени их деструкции. Кроме того, наблюдали существенное сокращение диаметра краевой зоны микропрепаратов. Это полностью согласуется с данными визуаметрического описания как кристаллоскопических, так и тизиграфических фаций. В частности, кристаллизуемость биосреды у обожженных составила $0,43 \pm 0,22$ балла (у здоровых людей $1,57 \pm 0,23$ балла), индекс структурности $0,16 \pm 0,21$ и $1,38 \pm 0,18$ балла, степень деструкции фации $2,32 \pm 0,31$ и $0,53 \pm 0,21$ балла, а выраженность краевой зоны $1,47 \pm 0,17$ и $2,15 \pm 0,22$ балла соответственно. Различия по отношению к практически здоровым людям по всем указанным параметрам статистически значимы ($p < 0,05$). В процессе комплексного лечения у представителей обеих групп отмечали однозначную тенденцию к нормализации собственной и инициированной 0,9% раствором хлорида натрия кристаллизации сыворотки крови, однако выраженность этих сдвигов была неодинаковой. Так, у пациентов группы сравнения, получавших только стандартное лечение, наблюдали умеренное повышение кристаллизуемости и индекса структурности в кристаллоскопических фациях сыворотки крови (до $0,87 \pm 0,16$ и $0,58 \pm 0,20$ балла соответственно; $p < 0,05$ по отношению к первой контрольной точке), что проявилось в формировании при кристаллизации биожидкости умеренного количества мелких одиночных кристаллических элементов. Кроме того, регистрировали повышение правильности структуропостроения последних, что реализовалось в форме снижения степени деструкции фации (до $1,70 \pm 0,23$ балла; $p < 0,05$ по сравнению с исходным состоянием). Также происходило незначительное расширение краевой зоны кристаллоскопических фаций сыворотки крови, что реализовалось в минимальном увеличении соответствующего параметра (на 13 относительно начала наблюдения; $p < 0,1$) и указывало на частичную нормализацию белкового состава биосреды. У больных с ожогами, которым комплексное лечение дополняли курсом внутривенного введения озонированного физиологического раствора, регистрировали более выраженную тенденцию к нормализации кристаллогенных свойств сыворотки крови. В частности, в кристаллоскопических фациях биологической жидкости обнаруживали появление не только одиночно-кристаллических, но и мелких дендритных элементов, что обуславливало весьма существенный прирост кристаллизуемости (до $1,24 \pm 0,19$ балла) и индекса структурности (до $0,98 \pm 0,23$ балла). Данный уровень параметра статистически значимо превышает цифры, характерные для первой точки наблюдения ($p < 0,05$). Следует отметить, что в этом случае значения обоих показателей существенно превышают аналогичные, выявленные для пациентов группы сравнения ($p < 0,05$). Подобная тенденция имеет место и в отношении двух других основных оценочных параметров собственного кристаллогенеза сыворотки крови. Так, степень деструкции фации снижается более отчетливо, что у представителей группы сравнения (до $1,44 \pm 0,20$ балла), значимо отличаясь как от уровня начала наблюдения, так и от значения, характерного для последних ($p < 0,05$ для

обоих случаев). Размер краевой зоны микропрепарата также существенно увеличивается, при этом уровень соответствующего параметра повышается на 29% относительно исходных значений и значения, обнаруженного для группы сравнения, достигая $1,89 \pm 0,21$ балла ($p < 0,05$).

Выводы. Проведенное исследование позволяет заключить, что дополнение стандартного протокола ведения тяжелообожженных пациентов курсом системной озонотерапии (введение озонированного физиологического раствора) способствует оптимизации физико-химических свойств и, следовательно, компонентного состава сывотки крови. Кроме того, результаты работы позволяют рассматривать изучение кристаллогенных свойств данного биосубстрата как способ оценки эффективности коррекции метаболических нарушений, возникающих при развитии у пострадавших ожоговой болезни.

Новый набор extra-DNA позволяет выделить более качественную ДНК из FFPE-образцов, чем QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

В. А. Мисюрин, Л. А. Кесаева, Ю. П. Финашутина, В. В. Тихонова, Н. А. Лыжко, О. Н. Солопова, А. А. Крутов, Е. Н. Пушкова, И. Н. Солдатова, А. Е. Мисюрина, А. С. Мкртчян, А. А. Сальник, А. В. Мисюрин

ООО «ГеноТехнология», г. Москва

'Extra-DNA' kit extracts more pure DNA from FFPE-samples than 'QIAamp DNA FFPE Tissue Kit'

V. A. Misyurin, L. A. Kesaeva, Yu. P. Finashutina, V. V. Tikhonova, N. A. Lyzhko, O. N. Solopova, A. A. Krutov, E. N. Pushkova, I. N. Soldatova, A. E. Misyurina, A. S. Mkrtchyan, A. A. Sal'nik, A. V. Misyurin
GeneTechnology Co., Moscow, Russia

Цель. Сравнить качество выделения ДНК из FFPE-образцов при использовании двух наборов реактивов: набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit компании QIAGEN и нового набора extra-DNA компании «ГеноТехнология».

Материалы и методы. С помощью представленных наборов были выделены ДНК из 20 образцов лимфатических узлов больных с онкологическими заболеваниями. Для выделения использовались срезы FFPE-образцов площадью не менее 20 мкм². После выделения проводилось сравнение концентрации ДНК и эффективность амплификации нуклеотидных последовательностей генов TP53 и АСТВ. Сравнение концентрации ДНК, полученной при помощи разных наборов, проводилось методом Манна-Уитни. Эффективность ПЦР-амплификации нуклеотидных последовательностей TP53 и АСТВ оценивалась электрофоретически.

Результаты. Согласно данным измерения концентрации ДНК, выделение из двух образцов при помощи наборов QIAamp DNA FFPE Tissue Kit и extra-DNA оказалось неудачным. Выделение из оставшихся 18 прошло успешно. Медиана значения концентрации ДНК, выделенной при помощи наборов QIAamp DNA FFPE Tissue Kit и extra-DNA, составила 211 и 228 мкг/мл соответственно. Различия в концентрации оказались статистически незначимыми ($p = 0,34$). Согласно данным электрофореза, амплификация фрагментов генов TP53 и АСТВ прошла в 16 из 18 образцов ДНК, выделенных при помощи набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, и в 18 из 18 образцов ДНК, выделенных при помощи набора extra-DNA.

Выводы. Выделение ДНК из FFPE-образцов проходило более успешно при использовании набора extra-DNA компании «ГеноТехнология» — можно получить более качественный образец, чем при выделении ДНК реагентами из набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit компании QIAGEN.

Изоформы трансформирующего ростового фактора, их биологическая активность и иммунопатология

А. В. Москалев, А. С. Рудой

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

Isoforms of transforming growth factor β , their biological effects and immunopathology

A. V. Moskalyov, A. S. Rudoy
The Military Medical Academy n.a. S. M. Kirov, Saint Petersburg, Russia

Введение. По современным представлениям в иммунопатогенезе аутоиммунной патологии лежат мультисистемные, плеiotропные изменения иммунного гомеостаза, среди которых выявлена значимая роль трансформирующего фактора роста бета — TGF β . TGF β существует в виде трех изоформ, которые экспрессируются в нормальных тканях млекопитающих и обозначаются как TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3. Изоформы TGF β имеют сходные биологические эффекты, однако наиболее выраженной экспрессией и значимой ролью при воспалении, ремоделировании и фиброзировании сосудов и миокарда обладает TGF β 1. Поэтому именно эта изоформа представляет наибольший интерес для исследователей. Начиная с 2005 года, нами изучалась роль молекулы TGF β в иммунопатогенезе наследственных нарушений соединительной ткани, а также в ряде других иммунопатологических состояний. Таким образом, TGF β принадлежит одна из ведущих ролей иммунопатогенезе многих заболеваний. Поэтому возникла необходимость, основываясь на данных литературы, представить информацию о биологии, структуре, путях активации и взаимосвязи TGF β с иммунопатологией в концентрированном виде.

Цель исследования. Провести анализ современных литературных данных о молекулярной физиологии TGF β и его роли в патофизиологии различных видов патологии.

Результаты и их обсуждение. TGF β 1 — непрямым митоген для мезенхимных клеток. TGF β 1 обладает ингибиторной активностью по отношению к Т- и В-клеточной пролиферации, к созреванию и активации макрофагов, является элементом обратной регуляции иммунного ответа, прежде всего, воспалительной реакции. TGF β 1 ингибирует активность НК-клеток, подавляет цитотоксическую активность CD8⁺-лимфоцитов, лимфокин-активированных киллеров, блокирует выработку цитокинов и секрецию некоторых иммуноглобулинов. В лимфоидных, эпителиальных и эндотелиальных клетках он является ингибитором роста. Определение TGF β 1 в периферической крови рекомендуется при диагностике различных заболеваний, связанных с хроническим воспалительным процессом (болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, синдром приобретенного иммунодефицита, болезнь Паркинсона, заболеваний костного мозга и костной ткани,

гломерулонефриты, нефропатия, диабет, гломерулосклероз, системная волчанка, аутоиммунный гепатит, синдром хронической усталости, сепсис, инсульт, опухоли различных тканей и др.). Повышенные уровни TGFβ1 определяется при синдроме хронической усталости и у пациентов при синдроме Гийена–Барре–Штроля]. Повышение сыровоточного уровня TGFβ1 у пациентов, страдающих тромбоцитопенической пурпурой, подразумевает его участие в гемопоэзе. Обратная корреляция уровня TGFβ1 с активностью заболевания описана при болезни Кавасаки, у пациентов с дефицитом IgA. Доказано, что TGFβ1 способствует фиброзным процессам. Показано, что определение уровня TGFβ1 в сыворотке и спинномозговой жидкости при множественном склерозе имеет большое значение для мониторинга ремиссии и активной фазы заболевания. TGFβ1 играет важную роль в метаболизме костного мозга, обсуждается его возможная роль регулятора остеокласт-остеобластного взаимодействия. Таким образом, он может рассматриваться как маркер остеопороза. TGFβ1 может играть модулирующую роль в опухолеобразовании. На ранних стадиях белки TGFβ1 в ряде случаев действуют как супрессоры опухолей. Определение циркулирующего TGFβ1 может отражать различные стадии при солидных опухолях. Повышение его уровня было выявлено при раке простаты, раке мочевого пузыря, раке печени. Снижение уровня TGFβ1 в сыворотке крови при сепсисе и инсульте может отражать изменение иммуно-воспалительного статуса пациентов. При преждевременных родах в околоплодных водах содержания TGFβ1 увеличено более чем в три раза. TGFβ1 способствует развитию атеросклеротических повреждений стенки сосудов на фоне усиления воспаления и снижения содержания коллагена, ведущего к ослаблению атеромы. Установлено, что у пациентов с ишемической болезнью сердца уровни TGFβ1 в сыворотке крови достоверно выше, чем у здоровых. TGFβ2 — внеклеточный гликозилированный белок, который связывает бета-амилоид; выполняет функцию сигнального белка-рецептора серин/треонин киназы; вызывает гомодимеризацию и гетеродимеризацию белков семейства Bcl-2. TGFβ2 участвует в морфогенезе клетки, в разделении соматических стволовых клеток и апоптозе, TGFβ2 инициирует апоптоз большинства типов клеток. TGFβ2 участвует в миграции глиальных клеток, организации межклеточного контакта, внеклеточной матричной организации и регулировании клеточной адгезии, способствует уплотнению хряща, развитию кровеносных сосудов, органов зрения, индуцирует ответ на гипоксию, обеспечивает эпителиально-мезенхимальный переход и развитие волосных фолликулов, активирует и дегранулирует тромбоциты. TGFβ2 блокирует активацию лимфоцитов и макрофагов; подавляет гемопоэз; синтез воспалительных цитокинов, пролиферацию лимфоцитов, формирование цитотоксических NK- и Т-клеток. TGFβ3 участвует в активации и увеличении количества остеобластов, хемотаксиса и синтезе коллагена. Если белок TGFβ3 не работает, то образуются расщелины верхнего неба (в некоторых случаях, и верхней губы), известные как «волчья пасть» и «заячья губа». С TGFβ3 также связана существенная роль развития легких, он регулирует клеточную адгезию в этой ткани. TGFβ3 задействован в пролиферации трофобластов; способен принимать участие в активации щелочных фосфатаз; участвует в регенерации повреждений, регулируя движения

эпидермальных клеток в травмированной коже и созреванию грануляционной ткани. Недостаточное количество TGFβ3 значительно уменьшает скорость эпителизации и миграции кератиноцитов. TGFβ3 может способствовать постоянной дисфункции кишечника. TGFβ3 способствует заживлению роговичных эпителиальных клеток при диабетической ретинопатии. Анализ молекулярных изменений в IL-23 дает представление о роли TGFβ3 в дифференцировке наивных Th в сторону клеток Th17-типа. Выявлено, что преобразование TGFβ3 выражено в верхних слоях эпидермиса на протяжении всего процесса заживления раны. Предполагают, что белок TGFβ3 может использоваться для восстановления хрящевой ткани суставных поверхностей при остеоартрите.

Заключение. Таким образом, установленные поливариативные особенности TGF позволяют на новом уровне понимать иммунопатогенез не только аутоиммунной патологии, но также соматической и инфекционной, прогнозировать течение заболевания и корректировать лечение

Изменение лабораторных и клинических показателей после операций направленной тканевой регенерации на тканях пародонта

Е. С. Родина, С. М. Киченко

ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии», г. Москва

Laboratory and clinical indicators' modification after surgical directed tissue regeneration treatment of periodontitis

E. S. Rodina, S. M. Kichenko

The Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia

При хирургическом лечении хронического генерализованного пародонтита чаще всего используют остеопластические материалы на основе неорганических кальций содержащих соединений. Эффективность их применения зависит от множества факторов. Лабораторных методов оценки эффективности их применения недостаточно, в настоящее время мало данных по изучению изменения активности ферментов, участвующих в реакциях синтеза и минерализации органической матрицы костной ткани и влияющих на фосфорно-кальциевый обмен, в динамике лечения. Перспективным материалом является отечественный «Стимул-Осс». Представляет интерес его использование при оперативном лечении хронического генерализованного пародонтита.

Цель исследования. Сравнить результаты лабораторных методов исследования и данные клинического применения материалов «Стимул-Осс» и «Био-Осс» при хирургическом лечении трехстеночных внутрикостных дефектов при хроническом генерализованном пародонтите средней и тяжелой степеней.

Задачи исследования. Методом конусно-лучевой томографии (КЛКТ) оценить восстановление костной ткани с помощью материалов «Стимул-Осс» и «Био-Осс»; биохимическими методами определить активность АСТ, АЛТ, щелочной и кислой фосфатаз, а также изучить содержание Ca²⁺ и неорганического фосфата в десневой жидкости пародонтальных карманов в динамике: до хирургического лечения, через 14 дней, 1, 3 и 6 месяцев после проведения операции.

Материалы и методы. В группу исследования вошли 90 трехстеночных внутрикостных дефектов, восстановленных «Стимул-Осс» (средняя степень тяжести ХГП — 41 и тяжелая — 49). Контрольная группа — 94 дефекта, восстановленных «Био-Осс» (средняя степень тяжести ХГП — 45 и тяжелая — 49). Клиническое состояние оценивали до операции и после проведения направленной тканевой регенерации через 14 дней, 1, 3, 6 и 12 месяцев с использованием индексов Силнесса-Лоэ, Мюллеманна. Глубину пародонтальных карманов измеряли по четырем точкам по общепринятой методике. Учитывали изменение уровня рецессии десны. КЛКТ выполняли до операции и через 12 месяцев после нее. Десневую жидкость из пародонтальных карманов собирали пять раз до шести месяцев наблюдения стерильными шприцами. Активность АСТ, АЛТ, ЩФ и КФ, содержание кальция и фосфора в десневой жидкости пародонтальных карманов проводили на анализаторе KoneLab 20i наборами BioSystems; Ca^{2+}/P на приборе Roche 9180 Electrolyte Analyzer ион-селективным электродом. Полученные результаты обрабатывали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты. Был выявлен положительный клинический результат при применении обоих материалов. У всех пациентов обеих групп отмечено снижение глубины ПК, отмечался прирост костной ткани. В группе «Стимул-Осс» глубина ПК в области дефектов при ХГП средней степени тяжести к 12-му месяцу уменьшилась с $5,1 \pm 0,3$ до $2,2 \pm 0,2$ мм ($p < 0,05$), а в группе с «Био-Осс» с $5,0 \pm 0,6$ до $2,0 \pm 0,3$ мм ($p < 0,05$). Рецессия десны в обеих группах отсутствовала (0 мм). В группе «Стимул-Осс» при восстановлении трехстеночных дефектов при пародонтите тяжелой степени глубина ПК к 12-му месяцу уменьшилась с $7,3 \pm 0,3$ до $3,0 \pm 0,3$ мм ($p < 0,05$), а в группе «Био-Осс» с $7,1 \pm 0,4$ до $2,4 \pm 0,3$ мм ($p < 0,05$), но статистически значимую разницу не установили ($p > 0,5$). Рецессия десны увеличилась с 0 до 1 мм в группе исследования и с 0 до 1,2 мм в группе контроля. Так как клинический эффект применения двух материалов не показал статистически достоверного отличия между ними, представилось интересным изучить в динамике изменение ряда биохимических параметров десневой жидкости: активность ферментов, участвующих в синтезе органической матрицы кости АСТ и АЛТ, и ее минерализации ЩФ и КФ, а также изменение концентрации ионов Ca^{2+} и P. Мы определили активность ферментов и ионов, затем произвели дополнительный расчет коэффициентов АСТ/АЛТ, ЩФ/КФ и Ca^{2+}/P . В течение одного месяца наблюдения коэффициент АСТ/АЛТ практически не отличался в обеих группах. Через три и шесть месяцев он был достоверно выше ($p < 0,05$) при использовании «Био-Осс», который более активно, чем «Стимул-Осс», оказывает влияние на синтез и перестройку органической матрицы кости. Таким образом, одним из преимуществ «Био-Осс» является более сильная активация им белкового обмена в костной ткани. Волнообразные изменения коэффициента ЩФ/КФ в обеих группах отражают определенную стадию процесса минерализации, имеющего два пика через 14 дней и три месяца наблюдения, что совпадает с известными по литературе сроками интенсивной минерализации вновь образованной органической матрицы костной ткани. Достоверное превышение через три месяца коэффициента ЩФ/КФ

($p < 0,05$) при введении «Био-Осс» свидетельствует о лучшем его влиянии как на синтез органической матрицы кости, так и на ее минерализацию. Интенсивность пиков через 14 дней и три месяца от начала наблюдения при применении «Био-Осс» свидетельствует о более быстром и более «завершенном» прохождении этапа минерализации новообразованной кости. Таким образом, «Био-Осс» лучше, чем «Стимул-Осс» влияет на синтез органической матрицы кости и, как следствие, ускоряет ее минерализацию. К 14-му дню наблюдения отмечен практически одинаковый уровень коэффициента Ca^{2+}/P в обеих группах пациентов. При «Стимул-Осс» он уже практически не меняется до конца наблюдения. Через один месяц динамика изменения коэффициента Ca^{2+}/P имеет разнонаправленный характер; если в группе с применением «Стимул-Осс» отмечено некоторое недостоверное его повышение, то при применении «Био-Осс» отмечено резкое и достоверное падение в два раза ($p < 0,01$), что свидетельствует о том, что ионы Ca^{2+} и неорганический P активно и более эффективно «захватываются» при его применении. Далее коэффициент Ca^{2+}/P постепенно нарастает до максимума и к шестому месяцу уже не отличается в обеих группах.

Выводы. Лабораторные и клинические исследования показали эффективность применения «Био-Осс» и «Стимул-Осс». Использованные коэффициенты позволили впервые по новому оценить динамику регенераторного процесса в костной ткани. Для лабораторного исследования применили простые биохимические методы и неинвазивно получаемую десневую жидкость, что позволило получить новые и оригинальные данные об некоторых особенностях хода регенераторного процесса и механизме действия использованных материалов. Клинические данные свидетельствуют о том, что наиболее эффективным использование «Стимул-Осс» оказалось в области трехстеночных дефектов с тяжелой степенью поражения. Незначительная разница между материалами в приросте костной ткани в 0,2 мм в пользу «Био-Осс» с позиции практического применения не является значимой. Что позволяет считать «Стимул-Осс» конкурентноспособным в силу его стоимости и рассматривать как материал выбора.

Интегральная оценка оксидативного статуса и детоксикационных систем крови в ранний период после термической травмы

А. Г. Соловьева

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, г. Нижний Новгород

Integral assessment of oxidative status and detoxification systems of blood in early period after thermal injury

A. G. Solovyova

The Privolzhsky Federal Medical Research Centre, Nizhny Novgorod, Russia

Известно, что изменение активности липопероксидации является одним из диагностических критериев тяжести патологического состояния. Следовательно, мониторинг состояния про- и антиоксидантных систем позволит не только исследовать механизмы прогрессирования окислительного стресса, как значимого компонента многих заболеваний, но и контролировать особенности его формирования.

Целью работы явилась оценка показателей окислительного статуса, системы биотрансформации в ранний период после термической травмы.

Материалы и методы. Для исследований использовали кровь 20 больных с ожогом более 15 % поверхности тела (II–III степеней, 1–4-е сутки после поражения). В качестве контроля брали кровь практически здоровых людей ($n = 15$). Показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ), общей антиоксидантной активности (АОА) плазмы крови и перекисную резистентность эритроцитов (ПРЭ) оценивали методом биохемилюминесценции (Е. И. Кузьмина с соавт., 2000). В эритроцитах определяли активность глутатионредуктазы (ГР) и каталазы по Г. В. Сибгатуллиной с соавт. (2011), альдегиддегидрогеназы (АлДГ) по Б. М. Кершенгольц, Л. П. Ильиной (1998), уровень малонового диальдегида (МДА) по методу В. Г. Сидоркина, И. А. Чулошниковой (1993) на спектрофотометре Power Wave XS. Результаты обрабатывали с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты. Показано, что уже с первых суток после ожога возрастала интенсивность ПОЛ в плазме крови на 56 % по сравнению с усредненным показателем здоровых людей ($p = 0,032$) на фоне компенсаторного роста АОА на 63 %. Увеличение антиоксидантного потенциала крови позволяет рассматривать этот показатель как один из маркеров реакции острой фазы воспаления. Повышение АОА направлено на компенсацию усиленного потребления антиоксидантов и ограничение деструктивных процессов в очаге поражения. Активация ПОЛ сочетается с развитием синдрома цитолиза, о чем свидетельствовало повышение интенсивности хемилюминесценции в эритроцитах в ранний период после ожога на 16 % по сравнению с нормой, соответственно снижалась ПРЭ ($p = 0,018$). В результате усиления липидной перекисидации при ожоге генерализуются токсичные среднепочечные альдегиды: алканали, алкенали и 4-гидроксикаленали. Продукты ПОЛ, в том числе и МДА, являются компонентами молекул средней массы. Поэтому особый интерес представляло изучение активности такого фермента детоксикации, как АлДГ. Выявленное статистически значимое снижение ее активности в 4,3 раза ($p = 0,001$) может привести к увеличению альдегидов, оказывающих повреждающее действие на ткани путем связывания с каталитическими центрами ферментов и нарушения метаболизма клетки. Кроме того, у пациентов с ожогами отмечено снижение активности ГР в 3,5 раза ($p = 0,009$). Падение каталитических свойств АлДГ и ГР в эритроцитах имеет прогностическое значение по той причине, что может привести к срыву всей системы детоксикации в органах и тканях, приводя к уменьшению защиты эритроцитов от окислительного действия эндотоксинов. Ингибирование АлДГ подтверждает выявленное увеличение МДА в 1,9 раза ($p = 0,021$) при ожоге. Проведенный корреляционный анализ обнаружил наличие достоверной отрицательной корреляции между АлДГ и МДА ($r = -0,36$; $p = 0,032$). Выявленный дезадаптивно повышенный уровень МДА может быть дополнительными диагностическими маркерами раннего периода развития ожоговой болезни. Из-

вестно, что фермент антиоксидантной защиты каталаза участвует в окислении спиртов, приводя к увеличению альдегидов. В ранние сроки после ожога показано повышение активности каталазы в 1,35 раза ($p = 0,012$), что обеспечивает эффективную защиту клеточных структур от разрушения под действием перекиси водорода, но также может привести к накоплению высокотоксичных метаболитов.

Заключение. Таким образом, для интегральной оценки окислительного статуса и детоксикационных систем крови в ранний период после термической травмы может оказаться полезным получение комплексной информации с помощью исследования интенсивности биохемилюминесценции, уровня МДА и определения активности антиоксидантных ферментов, дающих представление о состоянии не только АОА, но и системы биотрансформации.

Диагностика состояния энергетического метаболизма крови при термической травме

А. Г. Соловьева

ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава России, г. Нижний Новгород

Diagnostics of energy blood metabolism in thermal injury

A. G. Solovyova

The Privolzhsky Federal Medical Research Centre, Nizhny Novgorod, Russia

Хорошо известно, что важнейшей составляющей в патогенезе ожоговой болезни является энергетическая и белковая недостаточность, снижающая адаптационную резистентность организма и его компенсаторные возможности. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), находящаяся на развилке путей метаболизма углеводов, участвует в регуляции анаэробного и аэробного гликолиза. Обратимость лактатдегидрогеназной реакции позволяет паре субстратов лактат / пируват играть важную роль в контроле над отношением окисленных и восстановленных форм НАД в клетке. Поэтому оценка активности ЛДГ, а также показателей углеводного обмена позволит оценить ранние нарушения окислительно-энергетических реакций при термической травме.

Целью работы явилось исследование активности ЛДГ, уровня лактата и глюкозы в крови в ранний период после термической травмы.

Материалы и методы. Для исследований использовали кровь 20 больных с термической травмой (ожог более 15 % поверхности тела, II–III степени, 1–4-е сутки после поражения). В качестве контроля использовали кровь практически здоровых людей ($n = 15$). Концентрацию глюкозы и лактата измеряли на приборе марки Super GL ambulance. В эритроцитах определяли активность ЛДГ в прямой и обратной реакции на спектрофотометре Power Wave XS по Г. А. Кочетову (1980). Вычисляли коэффициент баланса энергетических реакций (КБЭР) по формуле: $КБЭР = (ЛДГ_{пр} / ЛДГ_{обр}) / (ЛДГ_{обр} / ЛДГ_{пр}) \times 100$, где $ЛДГ_{пр}$ — активность ЛДГ в прямой реакции (нмоль НАДН/мин.); $ЛДГ_{обр}$ — активность ЛДГ в обратной реакции (нмоль НАДН/мин.); 100 — поправочный коэффициент (патент № 2392865, 2010). Результаты обрабатывали с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты. Полученные результаты показали, что термическая травма сопровождается значительными изменениями в метаболизме углеводов, это выражается в угнетении активности ЛДГ: активность ЛДГ_{пр} уменьшилась на 13 %, ЛДГ_{обр} на 49 % по сравнению со здоровыми людьми. КБЭР повысился при ожоге в три раза с $3,10 \pm 0,07$ у здоровых людей до $9,15 \pm 0,18$ у больных с ожогом, что свидетельствует о снижении метаболизма у пациентов, уменьшении скорости протекания окислительно-энергетических реакций. Падение активности ЛДГ связано с дефицитом кислорода и способствует накоплению в крови лактата. Это подтверждает наличие высокой степени отрицательной корреляции между ЛДГ_{пр} и концентрацией лактата ($r = -0,76$; $p = 0,035$), отражая состояние энергетического обмена в клетках. Отмечена тенденция к возрастанию концентрации глюкозы при ожоге на 23 % по сравнению с нормой, вероятно, в результате усиления гликогенолиза и глюконеогенеза, что приводит к гиперметаболической перестройке в организме. В то же время клетка в условиях гипоксии более интенсивно расходует глюкозу с образованием лактата. Нами было зафиксировано резкое возрастание концентрации лактата в четыре раза по сравнению с усредненным показателем практически здоровых людей ($p = 0,023$), что характеризует выраженность анаэробного гликолиза, то есть недостаточности поступления кислорода и является доказательством развития эндогенной интоксикации. У всех пациентов отмечена высокая степень положительной корреляции между содержанием глюкозы и лактата ($r = 0,74$; $p = 0,031$). В условиях гипоксии клетка поддерживает энергетические потребности за счет активации процессов анаэробного гликолиза, который частично компенсирует недостаток АТФ, однако быстро вызывает накопление лактата.

Заключение. Таким образом, изучение активности лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакции и расчет КБЭР наряду с исследованием концентрации лактата и глюкозы позволит в ранние сроки выявить нарушения энергетического метаболизма крови и возможные осложнения у больных с термической травмой.

Оценка возможности использования методов «сухой химии» определения белка в моче как критерия для ожидания альбинурии

Е. Г. Степанова², О. Ю. Дорн^{1,2}, М. В. Паламарчук²,
Е. А. Цикаленко^{1,2}, Л. В. Вохминцева²

¹ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, ²ГБУЗ НСО «Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр», г. Новосибирск

Evaluation of possibility of using methods of 'dry chemistry' for determination of protein in urine as criterion for albuminuria waiting

E. G. Stepanova², O. Yu. Dorn^{1,2}, M. V. Palamarchuk², E. A. Tsikalenko^{1,2}, L. V. Vochminceva²

¹Novosibirsk State Medical University; ²the Novosibirsk State Regional Clinical Diagnostic Centre; Novosibirsk, Russia

Физиологическая потеря плазменных белков с мочой определяется фильтрацией их в клубочках и реабсорбцией в проксимальных канальцах. Клубочки почек функцио-

нируют как молекулярное сито для белков плазмы, через которое проходят белки малой молекулярной массы и задерживаются более крупные. Фильтрация белков зависит также от их количества, формы, заряда. Альбумин имеет отрицательный заряд, что препятствует его проникновению в ультрафильтрат. Альбинурия (АУ), представляющая повышение экскреции альбумина, наблюдается при изменениях в клубочках, возникающих у больных сахарным диабетом или артериальной гипертензией. АУ является довольно ранним признаком нарушения функции клубочков, когда болезнь еще может поддаваться медикаментозному лечению. Нормальным считаются значения экскреции альбумина с мочой менее 20 мг/л. АУ определяется иммунохимическим методом как экскреция альбумина с мочой от 20 до 200–300 мг/л утренней мочи. В настоящий момент определены предельно допустимые концентрации белка в моче в области нормального диапазона как критерий для ожидания АУ — раннего маркера заболеваний почечных клубочков. Таким критерием является уровень белка 80 мг/л (при определении белка в моче методом с пирогалловым красным [ПГК]). Однако многие лаборатории ограничиваются методом «сухой химии» для определения белка в моче.

Цель. Оценить возможность использования методов «сухой химии» в определении белка в моче как критерия для ожидания АУ.

Материал и методы. Обследованы 120 пациентов, сопоставимых по полу и возрасту. Всем пациентам проводилось определение общей концентрации белка в моче методом «сухой химии» (тест-полоски для анализатора мочи DIRUI [Китай] [полуколичественное определение]) и количественное определение ПГК-методом (набор реагентов «Вектор-Бест» [Россия] [нормальные значения до 120 мг/л]), АУ-иммунотурбидиметрическим методом (набор реагентов «Витал Диагностик СПб» [нормальные значения до 20 мг/л]). Статистическая обработка результатов проведена с помощью непараметрических методов программы Statistica 6.0.

Результаты. По результатам исследования все обследованные были разделены на три группы. В первую группу (20 человек) включены пациенты с концентрацией белка в моче до 80 мг/л (ПГК-методом). Данная группа рассматривалась как группа контроля по нормальным значениям белка и альбумина мочи. Во вторую группу (60 человек) включены пациенты с концентрацией белка в диапазоне от 80 до 120 мг/л. В этой группе мы можем ожидать АУ. В третью группу (40 человек) попали пациенты с концентрацией белка выше 120 мг/л. Эта группа пациентов рассматривалась как группа контроля по протеинурии и АУ. Итак, в первой группе в 100 % случаев были получены нормальные значения белка в моче как методом «сухой химии» так и методом ПГК. АУ в этой группе не выявлено. Во второй группе также в 100 % случаев нормальные значения белка в моче методом «сухой химии» совпадали с нормальным диапазоном белка в моче количественным методом (ПГК). Однако в данной группе была выявлена АУ в 31 % случаев (у 19 человек). Эти данные подтверждают, что уровень белка в моче выше 80 мг/л является критерием для ожидания АУ.

В третьей группе выявлено в 100 % случаев совпадение положительных значений белка в моче как методом «сухой химии», так и методом ПГК. Кроме того, в 95 % случаев была обнаружена АУ.

Выводы. Таким образом, метод «сухой химии» для определения белка в моче сопоставим с количественным методом с ПГК только в диапазоне нормальных значений до 120 мг/л. Уровень протеинурии 80 мг/л не обнаруживается полуколичественным методом, а следовательно, данный метод не может быть использован как скрининг для определения АУ. Данный факт свидетельствует о необходимости обязательного исследования белка в моче количественным методом с ПГК. Только данный метод может использоваться как скрининговый для выявления АУ, что необходимо для ранней диагностики заболеваний почек.

Состояние гемостаза, липидного и углеводного обмена при сочетании абдоминального ожирения с избыточной массой тела

В. А. Сумеркина, Вл. С. Чулков

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск

Hemostasis state, lipid and carbohydrate metabolism in abdominal obesity, combined with overweight

V. A. Sumerkina, Vl. S. Chulkov

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

В последние годы во всем мире широкое распространение получают такие заболевания, как артериальная гипертензия, сахарный диабет второго типа, метаболический синдром (МС), атеросклероз. Некоторые исследователи относят их к так называемым «метаболическим пандемиям». Согласно классическому представлению о патогенезе МС инициирующим фактором его развития является абдоминальное (висцеральное) ожирение (АО). В преобладающем большинстве случаев АО сопровождается избыточной массой тела или ожирением. Избыточное накопление висцеральной жировой ткани часто ассоциировано с метаболическими нарушениями, в этой связи в настоящее время его признают основным фактором риска сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности. Изменения в системе гемостаза и фибринолиза при МС дополнительно predisполагают к развитию кардиоваскулярной патологии.

Цель. Изучить взаимосвязь между показателями системы гемостаза, углеводного и липидного обмена у пациентов с АО, а также при сочетании АО с избыточной массой тела и ожирением.

Материалы и методы. В исследование были включены 86 пациентов обоего пола с АО в возрасте 20–45 лет. Пациенты были распределены в три группы: I группа (n = 12) — пациенты с АО и индексом массы тела 18,5–24,9 кг/м² (нормальная масса тела), II группа (n = 43) — пациенты с АО и индексом массы тела 25,0–29,9 кг/м² (избыточная масса тела), III группа (n = 31) — пациенты с АО и индексом массы тела выше 30,0 кг/м² (ожирение). Группу сравнения (IV группа) составили 55 человек без АО и дополнительных критериев метаболического син-

дрома с индексом массы тела 18,5–24,9 кг/м². В крови определяли показатели углеводного (глюкоза, инсулин, гликозилированный гемоглобин), липидного обмена (общий холестерин, холестерин липопротеидов высокой плотности [ХсЛПВП]), холестерин липопротеидов низкой плотности [ХсЛПНП], триглицериды), системы гемостаза (спонтанная и индуцированная агрегация тромбоцитов, активированное парциальное тромбопластиновое время [АПТВ], международное нормализованное отношение [МНО], тромбиновое время, концентрация фибриногена, активность антитромбина III, концентрация ингибитора пути тканевого фактора [ТФPI], активность плазминогена, время Хагеман-зависимого [ХЗФ] и эуглобулинзависимого фибринолиза [ЭФ], концентрация растворимых фибрин-мономерных комплексов [РФМК] и ингибитора активатора плазминогена I типа [РАI-1]).

Результаты. У пациентов I группы значимых отличий показателей углеводного и липидного обмена по сравнению с IV группой нами не было обнаружено. Однако установлены повышение уровня фибриногена (3,6 [3,3–4,3] г/л), а также изменения в системе антикоагулянтов — более низкая концентрация ТФPI (40,5 [30,0–69,1] нг/мл) и более высокая активность антитромбина III (111,3 [103,8–122,3]%) относительно группы сравнения (3,2 [2,9–3,5] г/л, 97,1 [45,4–151,2] нг/мл и 103,5 [97,6–111,4]% соответственно). У пациентов с абдоминальным ожирением фибриноген взаимосвязан с содержанием ХсЛПНП (r = 0,592), концентрация ТФPI с уровнем инсулина (r = 0,620) и триглицеридов (r = 0,632). В группе сравнения зависимости между описанными выше показателями установлено не было. При сочетании АО с избыточной массой тела у молодых пациентов нами были установлены дислипидемия: повышение общего холестерина (5,0 [4,4–5,9] ммоль/л); ХсЛПНП (2,7 [2,1–3,5] ммоль/л); триглицеридов (1,1 [0,8–1,] ммоль/л); снижение ХсЛПВП (1,8 [1,4–2,0] ммоль/л); более высокий уровень гликозилированного гемоглобина (4,9 [4,5–5,1]%) по сравнению с пациентами группы IV (4,4 [4,1–5,0] ммоль/л, (2,0 [1,7–2,5] ммоль/л, 0,8 [0,6–1,1] ммоль/л, 2,1 [1,8–2,4] ммоль/л, 4,2 [3,8–4,5]%) соответственно. Изменения в системе гемостаза отражали нарушения конечного пути свертывания — укорочение тромбинового времени (16,2 [15,7–17,1] с) и повышение концентрации фибриногена (3,8 [3,4–4,4] г/л); изменения фибринолитического звена — замедление ХЗФ (10 [8–12] мин.) и ЭФ (240 [200–300] мин.), рост концентрации Д-димера (120,5 [64,0–183,7] нг/мл) и РАI-1 (431,8 [256,2–621,0] нг/мл) относительно группы сравнения (16,6 [15,8–17,5] с, 3,2 [2,9–3,5] г/л, 9 [8–9] мин., 220 [180–240] мин., 54,4 [27,1–76,0] нг/мл, 264,1 [222,4–388,4] нг/мл соответственно). Несмотря на отсутствие в данной группе пациентов лабораторных признаков инсулинорезистентности, уровень инсулина и НОМА-IR были взаимосвязаны с концентрацией фибриногена (r = 0,305 и r = 0,329 соответственно), также содержание фибриногена коррелировало с уровнем холестерина (r = 0,315), ХсЛПНП (r = 0,417) и триглицеридов (r = 0,329). У пациентов III группы помимо изменений показателей системы гемостаза, углеводного и липидного обмена, характерных для сочетания АО с избыточной массой тела, определе-

но достоверно более высокое содержание глюкозы (5,7 [5,2–6,0] ммоль/л), инсулина (20,2 [10,3–25,4] мкМЕ/л) и значение индекса HOMA-IR (5,2 [2,6–6,3]) (группа IV — 5,0 [4,6–5,3] ммоль/л, 9,9 [7,1–14,7] мкМЕ/л, 2,1 [1,6–3,3] соответственно). Важно отметить, что данные показатели были выше не только по сравнению с пациентами без АО, но и с группами I и II.

Выводы. 1) Абдоминальное ожирение в молодом возрасте сопровождается повышением концентрации фибриногена независимо от наличия либо отсутствия избыточной массы тела. 2) У пациентов с АО и нормальным индексом массы тела в молодом возрасте определены изменения плазменного и антикоагулянтного звеньев системы гемостаза, при сочетании АО с избыточной массой тела или ожирением — плазменного и фибринолитического звеньев. 3) У пациентов молодого возраста с АО и избыточной массой тела установлены дислипидемия и повышение концентрации гликозилированного гемоглобина, с АО и ожирением — в сочетании с повышением концентрации глюкозы, инсулина и HOMA.

Прогностическое значение определения содержания витамина D в сыворотке крови беременных с ожирением

Н. А. Терехина, Е. Л. Макарова, М. М. Падруль

ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь

Prognostic value of determining content of vitamin D in blood serum of pregnant women with obesity

N. A. Teryokhina, E. L. Makarova, M. M. Padrul'

The Perm State Medical University n.a. E. A. Wagner, Perm, Russia

Цель работы — изучение влияния ожирения на содержание витамина D в сыворотке крови беременных женщин.

Материалы и методы. Основную группу составили 65 беременных с ожирением. В группу сравнения вошли 20 здоровых беременных женщин с нормальной массой тела (ИМТ $22,9 \pm 1,19$ кг/м²). Контролем служила сыворотка крови 120 здоровых небеременных женщин. Содержание 25-гидроксиколекальциферола (25-(ОН)-D₃) определяли в сыворотке крови иммуноэлектрохемилюминесцентным методом. При содержании в сыворотке крови 25-(ОН)-D₃ от 20 до 32 нг/мл диагностировали недостаток витамина D, при уровне 20 нг/мл — дефицит.

Результаты. Дефицит витамина D был выявлен у 47,0 % беременных с ожирением, 31 % беременных без ожирения, 22 % небеременных женщин. Недостаток витамина D был установлен у всех беременных с ожирением. При увеличении массы тела происходило снижение содержания 25-(ОН)-D₃ в сыворотке крови беременных женщин: при I степени ожирения $23,78 \pm 0,11$ нг/мл, при II степени $21,64 \pm 0,08$ нг/мл, при III степени $16,87 \pm 0,18$ нг/мл. Осложнения течения беременности и родов у женщин с ожирением наблюдались гораздо чаще, чем у беременных с нормальной массой тела: угроза прерывания беременности (соответственно 47,7 и 20 %), ранний токсикоз (соответственно 90,7 и 68 %), преэклампсия умеренной

степени (соответственно 16,9 и 5 %), фето-плацентарная недостаточность (соответственно 33,4 и 16 %). Только в группе женщин с ожирением выявлен гестационный сахарный диабет (6,1 %) и преэклампсия тяжелой степени (10,8 %). Осложнения течения родов чаще наблюдались у женщин с андронидным ожирением: в три раза чаще преждевременные роды и аномалии родовой деятельности (61 % против 20 %), в два раза оперативное родоразрешение путем кесарева сечения (34 % против 15 %). Только при андронидном ожирении были следующие осложнения: дистония плечиков (1,5 %), послеродовое гипотоническое кровотечение (4,5 %), дистресс плода (4,5 %), вакуум-экстракция плода (6 %). Выявлено более низкое содержание витамина D в сыворотке крови беременных с андронидным типом ожирения. Дефицит витамина D выявлен при определении 25-(ОН)-D₃ в сыворотке крови беременных с ожирением в зимнее время ($17,6 \pm 0,43$ нг/мл), недостаток этого витамина — летом ($24,0 \pm 0,29$ нг/мл). Сезонные закономерности свидетельствуют о роли витамина D и солнечного света в развитии преэклампсии беременных. Более высокая частота преэклампсии отмечена в зимнее время.

Выводы. Определение содержания витамина D в сыворотке крови беременных с ожирением имеет значение для прогнозирования осложнений матери и плода. Ожирение при беременности является фактором риска дефицита витамина D. Недостаток витамина D выявлен у всех беременных с ожирением, а у половины из них установлен дефицит данного витамина. Это способствует развитию инсулинорезистентности, развитию гестационного сахарного диабета, в результате срыва компенсаторных возможностей организма беременных с ожирением.

Применение интегральных лейкоцитарных индексов при оценке степени токсического влияния химических факторов на организм работников химического производства

Г. В. Тимашева¹, Э. Ф. Репина¹, А. Б. Бакиров¹, А. Ж. Гильманов², О. В. Валеева¹, А. З. Фагамова

¹ ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», ² ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России; г. Уфа

Using integral leucocyte indicators for assessment of chemically induced toxic impact level on chemical production workers' body

G. V. Timasheva¹, E. F. Repina¹, A. B. Bakirov¹, A. Zh. Gil'manov², O. V. Valeeva¹, A. Z. Fagamova²

The Ufa Research Institute for Occupational Medicine and Human Ecology; the Bashkirian State Medical University; Ufa, Russia

Несмотря на широкое внедрение в медицину новых методов, морфологический анализ крови и подсчет интегральных лейкоцитарных индексов благодаря большой информативности и методической доступности имеет важное диагностическое значение. Адаптационные реакции организма в ответ на вредные производственные факторы в значительной мере выражаются в количественном и качественном изменениях лейкоцитарной формулы периферической крови. По данным ряда авто-

ров (Зюбина Л. Ю., Шпагина Л. А., Паначева Л. А., 2008; Тимашева Г. В., Бадамшина Г. Г., Каримова Л. К., 2012), под воздействием химических факторов производства могут развиваться транзиторные изменения со стороны периферической крови, формируется системное нарушение гомеостаза, происходит изменение показателей клеточного метаболизма, одним из проявлений которого является феномен эндогенной интоксикации (ЭИ) организма. В литературе появляются сообщения об использовании интегральных лейкоцитарных индексов для определения тяжести ЭИ, которая изменяется уже в предпатологический период или на самых ранних стадиях заболевания. Оценка условий труда в производствах ОАО «Стеклолит», проведенная сотрудниками отдела гигиены и физиологии труда ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», установила, что в воздухе рабочей зоны присутствуют потенциально опасные химические вещества II–III классов опасности: это стекловолокно и пыль стекла, сложные эфиры, ароматические углеводороды (бензол и его производные), канцерогены (толуол, ксилол, стирол, формальдегид), соединения кремния.

Цель. Изучение морфологического состава крови и интегральных лейкоцитарных индексов для оценки степени токсического влияния химических факторов на организм работников производства в зависимости от профессии и стажа.

Материалы и методы. Обследованы 197 работников ОАО «Стеклолит», которые составили основную группу: операторы получения непрерывного стекловолокна (30,5 %), размотчики (21,3 %), вязальщики (19,3 %), ткачи (17,8 %) и эмульсовары (10,2 %), средний возраст которых $38,9 \pm 0,6$ года при стаже работы $13,7 \pm 1,6$ года. Группа сравнения представлена 114 работниками ООО «Медстальконструкция», не имеющими контакта с химическими факторами на производстве, средний возраст которых $41,6 \pm 0,9$ года при стаже работы $14,6 \pm 0,7$ года. Исследования включали анализ периферической крови, выполненный на гематологическом анализаторе Sysmex KX21N, подсчет лейкоцитарной формулы. Были рассчитаны интегральные лейкоцитарные индексы интоксикации (ЛИИ) по формуле Я. Я. Кальф-Калифа в модификациях В. К. Островского и соавт. (1983), по формуле С. Ф. Химич, индекс сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК) у обследованных работников обоих предприятий. Полученные результаты были обработаны с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel с определением средних величин, показателя достоверности по коэффициенту Стьюдента (t) и уровня значимости (p).

Результаты. Анализ результатов гематологических исследований установил статистически значимые повышения среднegrupповых значений количества лейкоцитов у работников основной группы ($7,03 \pm 0,12 \times 10^9/\text{л}$) относительно уровня данного показателя у обследованных группы сравнения ($5,95 \pm 0,15 \times 10^9/\text{л}$); эритроцитов — $4,53 \pm 0,03 \times 10^{12}/\text{л}$ и $4,01 \pm 0,03 \times 10^{12}/\text{л}$; СОЭ — $7,77 \pm 0,26$ мм/час и $5,47 \pm 0,36$ мм/час и сегментоядерных нейтрофилов лейкоцитарной формулы — $65,85 \pm 0,83$

и $51,57 \pm 0,92$ % у работников основной группы и группы сравнения соответственно. Анализ результатов исследований, полученных у работников с различным стажем работы на производстве, выявил повышение доли лиц с эритроцитозом и пониженным уровнем гемоглобина в зависимости от стажа работы, что может быть связано с напряжением функций организма в связи с гипоксией и мобилизацией компенсаторных механизмов, развивающихся в ответ на действие химического фактора. Для оценки степени выраженности эндогенной интоксикации и степени токсического влияния химических факторов на организм работников были рассчитаны лейкоцитарные индексы интоксикации (ЛИИ), которые показывают количественное выражение сдвига лейкоцитарной формулы. Оценка полученных результатов показала значительное повышение ЛИИ в модификации В. К. Островского, средние значения которого: $2,18 \pm 0,09$ у работников основной группы и $1,11 \pm 0,05$ у обследованных группы сравнения. Повышенные значения данного ЛИИ у работников основной групп (49,7 %) встречались чаще в семь раз при сопоставлении с группой сравнения (7,0 %). Были установлены средние значения ЛИИ в модификации С. Ф. Химич — $1,56 \pm 0,07$ и $0,70 \pm 0,05$ у обследованных основной группы и группы сравнения, повышенные — у 22,8 и у 6,1 % лиц соответственно. Индекс сдвига лейкоцитов крови определялся повышенным у 33,5 % лиц основной группы и у 2,6 % группы сравнения, средние значения которого были $2,33 \pm 0,09$ и $1,23 \pm 0,05$ соответственно. Повышение значений вышеуказанных индексов свидетельствует не столько об увеличении количества палочко- и сегментоядерных нейтрофилов и лейкоцитозе, а сколько о наличии эндогенной интоксикации в организме обследуемых работников производства. Важно подчеркнуть, что различия по среднegrupповым значениям и частоте повышения всех ЛИИ у работников основной группы были статистически достоверными при сопоставлении с группой сравнения, что указывает на диагностическое значение ЛИИ. Необходимо отметить, что наибольшее количество лиц с отклонениями всех ЛИИ отмечалось в первой стажевой группе (0–5 лет), что указывает на прогностическое значение данных показателей при определении степени токсического влияния химических факторов производства на организм работников производства.

Выводы. 1) Специфический характер воздействия веществ, присутствующих в воздухе рабочей зоны производства, подтверждается выявленными изменениями показателей красной и белой крови у работников производства стекловолокна. 2) Применение интегральных лейкоцитарных индексов позволяет определить уровень эндогенной интоксикации в организме работников, что может привести к развитию профессионально-обусловленных заболеваний. 3) Данные методы являются информативными, диагностически и прогностически ценными при оценке степени токсического влияния химических факторов на организм, что позволяет рекомендовать их в профпатологической практике для допатологической диагностики изменений в организме работников химического производства.

Опыт применения дублирующего оборудования для биохимического тестирования в условиях клинико-диагностической лаборатории на примере Architect c8000 и UniCell DxС 800 Synchron

Л. А. Хоровская, Л. В. Котенко, Ю. П. Ковальчук

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

Experience of use of duplicating equipment for testing biochemistry analytes in clinical diagnostic laboratory on example of Architect c8000 and UniCell DxС 800 Synchron units

L. A. Khorovskaya, L. V. Kotenko, Yu. P. Kovalchuk

The First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

В современных условиях медицинские лаборатории используют анализаторы разных производителей с однотипным ассортиментом исследований, обеспечивая бесперебойный операционный диагностический процесс для практической клинической медицины. Применение дублирующего оборудования требует предоставления информации клиницистам о гармонизации, или обеспечении сопоставимости получаемых результатов, в условиях лечебно-профилактического учреждения для возможности правильной интерпретации данных лабораторных исследований. Гармонизация достигается с помощью применения единого стандарта Р ГОСТ ИСО 15189 для клинико-диагностических лабораторий, в котором отмечается необходимость проведения межприборных и межлабораторных сравнений для оценки сопоставимости данных лабораторного тестирования в условиях одного или нескольких лечебных учреждений. Институт клинико-лабораторных стандартов (CLSI) разработал методические рекомендации для проведения сравнения результатов, полученных на двух разных инструментах, изложенные в протоколе CLSI EP9-A «Метод сравнения и оценки смещения с помощью проб пациентов», который позволяет определить смещение и оценить аналитическую вариацию работы каждого инструмента при измерении одних и тех же проб плановых пациентов в дубликатах на разных анализаторах. Оценка сопоставимости результатов биохимических исследований крови является актуальной задачей для медицинских лабораторий, так как практикующие врачи используют эту информацию как при диагностике, скрининге и мониторинге патологических состояний.

Целью настоящего исследования явилось проведение сравнения результатов наиболее востребованных 14 биохимических аналитов в соответствии с международным протоколом CLSI EP9-A для оценки сопоставимости получаемых результатов, выполненных при измерении на биохимических анализаторах Architect c8000 (Abbott, США) и UniCell DxС 800 Synchron (Beckman Coulter, США).

Материалы и методы. Исследование выполнялось в лаборатории клинической биохимии отделения лабораторной диагностики Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени

академика И. П. Павлова. Образцы венозной крови, взятые в соответствии с требованиями преаналитического этапа, измерялись в дубликатах у 40 плановых пациентов на анализаторах Architect c8000 и UniCell DxС 800 Synchron по следующим показателям: глюкоза, холестерин, общий белок, альбумин, общий кальций, калий, натрий, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ), общий и прямой билирубин, щелочная фосфатаза, креатинин и мочевины. Результаты анализировались в соответствии с требованиями CLSI EP9-A2-IR с вычислением среднего значения (X_{cp}), полученного из дубликатов для каждой пробы, среднего квадратичного отклонения (SD), коэффициента аналитической вариации сходимости (CV %), смещения (B %) и оценкой параметров регрессионного анализа. Анализ клинической значимости выявленных статистических различий основывался на величине приемлемой общей ошибки (ATE, TE%), с учетом базы данных по биологической вариации.

Результаты. Результаты сравнения биохимических показателей показали, что 8 из 14 измеряемых аналитов имели статистически значимые различия ($p < 0,05$): альбумин, АСТ, глюкоза, общий билирубин, креатинин, общий белок, мочевины, общий кальций. Результаты измерений альбумина, АСТ, глюкозы, общего билирубина, мочевины были в пределах АТЕ, поэтому имеющиеся различия не оказывают влияния на клиническую интерпретацию. Некоторое превышение АТЕ было отмечено в результатах для общего белка и креатинина ($p > 0,05$). Выявленные различия не оказывают влияния на интерпретацию результатов для уровней концентрации белка, так как все полученные значения имеют минимальное смещение ($1,1 \pm 0,3\%$). Однако уровни концентрации креатинина, полученные на UniCell DxС 800 Synchron были выше, чем на Architect c8000 ($p < 0,05$), что может вызвать сложности при интерпретации результатов у одного и того же пациента, полученных на разных анализаторах, особенно при контроле динамики проводимой терапии. TE% превысила приемлемые критерии для общего кальция и натрия ($p < 0,05$). Несмотря на отсутствие значимых различий в результатах измерения концентрации натрия в сыворотке крови, величина TE%, учитывающая показатели аналитического качества, имела существенные отличия ($1,7\%$ для UniCell DxС 800 Synchron и $1,1\%$ Architect c8000 C; $p < 0,05$). TE% для натрия сыворотки крови, исходя из измерений на тестируемых анализаторах, также отличались и с рекомендованным критерием качества ($0,7\%$), исходя из базы данных по биологической вариации ($p < 0,05$), на что необходимо обратить внимание при интерпретации результатов лабораторного исследования при ведении пациентов в критических состояниях. Полученные различия для результатов при измерении общего кальция обусловлены наличием смещения ($1,9 \pm 0,6\%$), которое превысило международные критерии качества ($0,8\%$; $p < 0,05$), что связано с тем, что в работе анализаторов использованы разные методы для исследования общего кальция. Выявленные особенности необходимо учитывать при интерпретации результатов у пациентов, находящихся в критических состояниях

и при таких патологических процессах, как гипер- и гипопаратиреозы, интоксикация, дегидратация, поражение костной ткани, онкологические заболевания, саркоидоз, болезнь Педжета, тиреотоксикоз, акромегалия, дефицит витамина Д, почечная недостаточность, и др.

Выводы. Оценка сопоставимости результатов лабораторных исследований, выполненных на дублирующих анализаторах в условиях одной лаборатории на анализаторах Architect с8000 и UniCell DxС 800 Synchron показала, что результаты измерений уровней концентрации глюкозы, холестерина, общего белка, альбумина, калия, АЛТ, АСТ, ЩФ, общего и прямого билирубина, мочевины могут адекватно интерпретироваться клиницистами. Разницу в результатах сравнительных измерений креатинина, общего кальция и натрия в сыворотке необходимо учитывать при клинической интерпретации данных. Выявленные проблемы сопоставимости результатов измерений обусловлены особенностью применяемых методов исследования и различием в характеристиках аналитического качества, что приводит к необходимости проводить процедуру сравнения результатов дублирующего оборудования в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений.

Гликемический контроль в месте лечения: требования стандартизации и практика

Л. А. Хоровская, Т. В. Лобачевская, О. В. Черничук

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург; АУ Ханты-Мансийского автономного округа — Югра «Центр профессиональной патологии», г. Ханты-Мансийск

Point-of-care glycemic control: demands to standardization and practice

L. A. Khorovskaya, T. V. Lobachevskaya, O. V. Chernichuk
The First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, Saint Petersburg; the Centre for Professional Pathology of Khanty-Mansi Autonomous Area — Yugra, Khanty-Mansiysk; Russia

Современная лабораторная медицина позволяет проводить измерения уровня глюкозы крови в максимально приближенных к пациенту условиях с помощью методов диагностики в точке помощи (point of care testing, РОСТ), что является актуальным вопросом практического здравоохранения для обеспечения эффективного ведения пациентов с сахарным диабетом. В соответствии с требованиями международной стандартизации применение приборов РОСТ подразделяется на два типа: для использования только в медицинских учреждениях (тип 1) и для индивидуального измерения концентрации глюкозы крови самими пациентами (тип 2). Тип 1 предназначен для тестирования медицинским персоналом клинических и лабораторных подразделений в условиях учреждений здравоохранения, правила его применения регламентируются ГОСТ Р ИСО 22870 (ISO 22870) и контролируются клинко-диагностической лабораторией (КДЛ). Эффективный и качественный лабораторный контроль гликемии приборами диагностики возле пациента в повседневной жизни чаще всего проводится с помощью приборов РОСТ типа 2, предназначенных для самотестирования уровня глюкозы непосредственно

лицами, страдающими сахарным диабетом в домашних условиях в соответствии с новой версией стандарта DIN EN ISO 15197–2:2013. Несмотря на разделение правил гликемического контроля в зависимости от разных типов приборов РОСТ, международная стандартизация рекомендует придерживаться точностных характеристик работы систем мониторинга глюкозы, обозначенных в DIN EN ISO 15197–2:2013, который предусматривает, что 95 % результатов измерений концентрации глюкозы для трех лотов тест-полосок при концентрации глюкозы ниже 5,6 ммоль/л должны выполняться с точностью $\pm 0,83$ ммоль/л, а при концентрации выше 5,6 ммоль/л в пределах ± 15 %. Кроме того, введенные требования содержат оценку результатов измерений концентрации глюкозы по шкале ошибок Кларка с 99 % нахождением в клинически точных зонах А и Б, обеспечивающих безопасность пациентов. Требования клиницистов к проведению интенсивного гликемического контроля с помощью портативных устройств измерения глюкозы предлагают придерживаться более высоких точностных характеристик, не превышающих общую ошибку (TE %) $\pm 0,0$ %, исходя из базы данных по биологической вариации, для предотвращения ошибок в назначении доз инсулина. Для измерения уровня глюкозы в биологических жидкостях применяются портативные устройства РОСТ, называемые глюкометрами. Для проведения рутинного гликемического контроля пациенту необходимо измерить уровень глюкозы капиллярной крови с максимально упрощенными процедурами преаналитического и аналитического этапов лабораторного процесса. Глюкометры стали неотъемлемой составляющей оказания помощи лицам, страдающим сахарным диабетом, от качества работы которых зависит эффективность ведения пациентов с данной патологией. Современная лабораторная медицина рекомендует проводить сравнение характеристик работы глюкометров для изучения качества их работы и оценки сопоставимости результатов измерения глюкозы крови.

Целью настоящего исследования явилось сравнение результатов измерения уровней концентрации глюкозы, полученных на индивидуальных портативных глюкометрах разных производителей с оценкой точностных характеристик каждого прибора в соответствии с DIN EN ISO 15197–2:2013 и оценка влияния полученных расхождений на интерпретацию результатов лабораторного исследования.

Материалы и методы. Исследовались пробы цельной венозной крови, взятые в вакуумные пробирки BD с K2EDTA в двух уровнях концентрации глюкозы 4,5 и 11,8 ммоль/л на глюкометрах Accu-Chek Active («Рош Диагностика ГмбХ», Германия), One Touch Select (Jonson & Jonson, Великобритания), «Сателлит-экспресс» (Россия) и Countor TS (Bayer, США), которые измерялись повторно по шесть раз в эугликемической и в гипергликемической концентрациях глюкозы в трех лотах в течение двух часов при $+20$ °С. Полученные на разных глюкометрах данные сравнивались между собой и с результатами тех же проб пациентов, измеренных на референтном биохимическом анализаторе Olympus AU 400

(США) по методу кураторского подхода и разделенной пробы пациента (Split sample) и анализировались в соответствии с DIN EN ISO 15197–2:2013 и рекомендациями клиницистов к проведению интенсивного гликемического контроля.

Результаты. Полученные результаты показали, что общая ошибка (TE %) для глюкометров Accu-Chek Active и One Touch Select была в пределах критериев точности. TE% составила 6,1 % в нормогликемическом уровне и 2,4 % в гипергликемическом для Accu-Chek Active и 6,1 и 7,7 % соответственно для One Touch Select. TE% результатов измерений «Сателлит-экспресс» превысила ($p < 0,05$) требуемую точность при нормогликемической концентрации (15,4 %). Общая ошибка результатов Countor TS не соответствовала ($p < 0,05$) установленным критериям качества для интенсивного контроля гликемии (12,7 %). Полученные данные для TE% на глюкометрах «Сателлит-Экспресс» и Countor TS обусловлены повышенной межлотовой вариабельностью тест-полосок ($p < 0,05$ %) при эугликемии (14,5 % для «Сателлит-экспресс» и 11,7 % для Countor TS) по сравнению с Accu-Chek Active (4,6 %) и One Touch Select (2,5 %). Обращает внимание выраженное отрицательное смещение (B %) при эугликемии на «Сателлит-экспресс» (–15,6 %) и Countor TS (–13,3 %), а также для гипергликемии на глюкометре Countor TS (–24,4 %). Занижение результатов измерений в нормальном уровне концентрации глюкозы на «Сателлит-экспресс» и Countor TS может привести к неправильной интерпретации данных и особенно опасно при гипогликемических состояниях. Систематическое отрицательное смещение во всем диапазоне измерения, полученное на Countor TS, повышает риск для ведения больных диабетом в связи с ошибками оценки пределов принятия решения и назначении доз инсулина.

Заключение. Проведенное сравнение результатов гликемического контроля в месте лечения, выполненное с помощью портативных устройств самомониторинга глюкозы, выявило занижение результатов измерений при эугликемии при тестировании глюкометров «Сателлит-экспресс» и Contour TS, а для Countor TS во всем диапазоне измерения глюкозы. Анализ точностных характеристик показал соответствие международным критериям качества работы приборов по измерению глюкозы, описанным ISO 15197:2013, для глюкометров Accu-Chek Active и One Touch Select и превышение норм систематической точности для низких уровней концентрации глюкозы для глюкометра «Сателлит-экспресс». Характеристики качества измерения уровней концентрации глюкозы, полученные при тестировании глюкометров «Сателлит-экспресс» и Contour TS не соответствовали рекомендациям клиницистов для интенсивного контроля гликемии, основанным на международной базе данных по биологической вариации. Выявленное расхождение результатов тестирования систем мониторинга глюкозы влияет на интерпретацию результатов, что подтверждает необходимость проведения оценки качества гликемического контроля в месте лечения для обеспечения безопасности пациентов.

Современные тренды оценки качества вакуумных пробирок для гематологических и коагулологических исследований в клиничко-лабораторной практике учреждений здравоохранения

Л. А. Хоровская, И. О. Шмидт

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святого Луки», г. Санкт-Петербург

Modern trends of quality assessment of vacuum tubes for hematology and coagulation in clinical laboratory practice of medical institutions

L. A. Khorovskaya, I. O. Schmidt
The First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov; the Saint Luka State Clinical Hospital; Saint Petersburg, Russia

Преаналитический этап лабораторных исследований играет важную роль в диагностическом процессе. Использование высококачественных систем для взятия крови для лабораторных исследований является необходимостью, так как применение несоответствующих вакуумных пробирок может быть источником преаналитической вариации и влияет на результаты лабораторного тестирования. Для качественной работы медицинских лабораторий требуется выполнение стандарта ISO 15189:2012 «Лаборатории медицинские — специальные требования к качеству и компетентности», который содержит специальный раздел, касающийся преаналитического этапа для его стандартизации и контроля согласно методам доказательной практики. Несмотря на рекомендации по гарантии качества на преаналитическом этапе, роль проверки надежности вакуумных систем для взятия крови в условиях медицинских лабораторий недооценивается администрацией лечебно-профилактических учреждений, и приоритетом выбора брендов оборудования преаналитического этапа в большинстве случаев является ценовая политика. Обеспечение безопасности лечебно-диагностического процесса приводит к необходимости оценки качества вакуумных пробирок в условиях медицинских лабораторий, что определяет актуальность данного вопроса преаналитического этапа.

Целью настоящего исследования явились определение критериев надежности вакуумных пробирок и оценка сопоставимости результатов гематологических и коагулологических исследований, полученных из вакуумных пробирок с K_2 ЭДТА и 3,2-процентным цитратом Na новой производственной линии Lind-Vac (Эстония) по сравнению с мировым лидером вакуумных систем взятия крови пробирками системы Vacuette фирмы Greiner (Австрия) в соответствии с требованиями международной стандартизации.

Материалы и методы. Критерии надежности закрытых вакуумных систем в настоящее время находятся в процессе разработки участниками рабочей группы по преаналитическому этапу лабораторных исследований Европейской федерации по клинической химии и лабораторной медицине (EFLM WG-PRE), которая в настоящее время работает над созданием консенсусного документа по валидации оборудования преаналитического этапа

лабораторных исследований при участии специалистов по лабораторной диагностике Российской Федерации. EFLM WG-PRE определила набор технических требований (физические дефекты, непригодность в работе, проблемы безопасности) и клинических критериев в помощь лабораторному персоналу в организации взятия крови в пробирки и процедуры верификации новых устройств взятия крови в локальных условиях рутинных лабораторий. Для оценки надежности и сопоставимости результатов гематологических исследований, полученных из вакуумных пробирок разных производителей, были использованы рекомендации международного протокола CLSI GP-34A «Валидация и верификация пробирок для взятия венозной и капиллярной крови». В соответствии с рекомендованными международными методиками была исследована кровь 40 плановых пациентов, взятая в пробирки K₂ ЭДТА Lind-Vac (Эстония) и 3,2-процентный цитрат Na по сравнению с мировым лидером вакуумных систем взятия крови пробирками системы Vacuette фирмы Greiner (Австрия), которая анализировалась в дубликатах по 20 стандартным гематологическим и трем коагулологическим показателям (активированное частичное тромбопластиновое время [АЧТВ], протромбиновое время [ТВ], фибриноген) на гематологическом анализаторе Hemalit 5500 Corway (Китай) и коагулологическом ACL Elite Pro (Instrumentation Laboratory, США).

Результаты. EFLM WG-PRE выделила следующие критерии оценки качества для вакуумных пробирок: физические дефекты пробирок, недостаточное количество вакуума, проблемы при соединении пробирок с иглами, неполное заполнение пробирок кровью, протекание крови через крышечку пробирки, загрязнение наружной поверхности пробирок кровью после взятия крови, гемолизированные пробы, образование сгустков в пробирках с K₂ ЭДТА и цитратной плазмой, поломанные пробирки после центрифугирования, пробирки с неполным образованием сгустка для пробирок с активатором сгустка и несоответствующее расположение разделительного геля при использовании пробирок с гелем. Список данных критериев находится в процессе валидации для возможного внедрения в медицинские лаборатории. Официально утверждена для внедрения процедура сравнения результатов исследований, полученных из пробирок разных брендов протокола CLSI EP9-A2-IR «Метод сравнения и оценки смещения с помощью проб пациентов», включенная в требования CLSI GP-34A. Оценка сопоставимости результатов ге-

матологических исследований в соответствии с данным протоколом показала идентичные результаты, полученные в пробирках разных производителей ($p > 0,05$). Коэффициент вариации сходимости (CV %) был выше у проб, полученных из пробирок Lind-Vac по шести параметрам: концентрация эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, нейтрофилов, процентное содержание нейтрофилов и гематокрит ($p < 0,05$); а у проб, полученных из пробирок Greiner CV%, для концентрации и абсолютного содержания моноцитов ($p < 0,05$). Выявленные особенности в различиях аналитического качества при оценке показателей сходимости эритроцитарных показателей и тромбоцитов для каждого вида пробирок не влияют на величины средних значений, однако их необходимо учитывать при диагностике проб пациентов с подозрением на анемию и некоторых нарушениях гемостаза, так как они отражаются на величине общей ошибки (TE %), которая является ориентиром качества для клинической интерпретации, основанной на базе данных по биологической вариации. Наблюдаемые тенденции в различии показателей аналитического качества при проведении гематологических исследований могут быть объяснены неоднородностью размера частиц антикоагулянта, вариабельностью концентрации наполнителя, особенностью пластикового материала и являются закономерными в условиях лабораторного маркетинга. Результаты измерений, коагулологических показателей, полученные из пробирок с 3,2-процентным цитратом Na, были идентичными как по средним значениям, так и по показателям сходимости ($p > 0,05$) с приемлемыми показателями TE%, что не вызывает проблем интерпретации данных у пациентов с нарушениями свертывания крови.

Выводы. Клинико-диагностическим лабораториям необходимо внедрять современные методы оценки качества вакуумных пробирок для обеспечения качества преаналитического этапа лабораторных исследований, что является требованием для аккредитации медицинских лабораторий. Исследование сопоставимости результатов гематологических и коагулологических исследований, выполненных из пробирок Lind-Vac, по сравнению с Vacuette не выявило значимых различий в результатах, однако медицинским лабораториям необходимо учитывать тенденции в различиях при оценке показателей аналитического качества гематологических исследований при диагностике анемий и некоторых нарушениях гемостаза.



Подписка

Уважаемые читатели!

Вы можете оплатить подписку по следующим реквизитам издательства:

ООО «Альфмед» ИНН 7716213348,

Р/с № 40702810738090108773 в Московский Банк Сбербанка России, ПАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. Москва, К/с 30101810400000000225 БИК 044525225

Медицинский алфавит

Годовая подписка на журнал «Современная лаборатория» серии «Медицинский алфавит».

Цена 1600 руб за 2016 год, 1600 руб за 2017 год.

Просьба указать почтовый адрес доставки.

Контакт: medalfavit@mail.ru, +7(495)616-48-00, +7(495)221-76-48.