



**№ 2 (42) июнь 2012**

Главный редактор:

**Эмануэль В. А.**, д. м. н., проф.

Заместители главного редактора:

**Зыбина Н. Н.**, д. б. н., проф.

**Сухоруков В. С.**, д. м. н., проф.

Директор редакции:

**Чередниченко Д. В.**, к. м. н.

Зав. редакцией:

**Эмануэль Ю. В.**, к. м. н.

Редактор перевода:

**Филиппова Н. А.**, к. м. н.

Ответственный секретарь

**Джавлах Е. С.**

Адрес редакции:

**197022, Санкт-Петербург,  
ул. Льва Толстого, д. 6/8**

Телефон редакции:

**(812) 233 97 26**

Эл. почта:

**ejvcons@mail.ru**

Журнал зарегистрирован

в Федеральной службе

по надзору в сфере связи,

информационных технологий

и массовых коммуникаций

(Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации:

ПИ №ФС77-38698 от 22.01.2010

Учредитель:

**ГОУ ВПО «СПб Государственный**

**медицинский университет**

**им. акад. И. П. Павлова**

**Федерального агентства**

**по здравоохранению**

**и социальному развитию»**

(197022, Санкт-Петербург,

ул. Льва Толстого, д. 6/8)

Журнал издается при поддержке

**ООО «АкваТест СПб»**

Решением Методического Совета

СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова

от 04.10.2010 журнал является

учебно-методическим пособием

для всех кафедр университета

при реализации циклов повышения

квалификации на ФПО.

Подготовка к печати и печать:

ООО «Издательско-

полиграфическая

компания «КОСТА»»,

тел. **(812) 445 10 02**

Санкт-Петербург,

Новочеркасский пр., д. 58

Тираж 2000 экз.

Заказ №



# КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Совершенно очевидно, что успехи внедрения достижений медицинской науки в практическое здравоохранение во многом зависят от своевременности и качества лабораторного обеспечения лечебно-диагностического процесса.

Одна из граней результативности применения современных наукоемких лабораторных технологий является мотивом глубокого изучения основ лабораторной медицины специалистами различных клинических специальностей. Возможности этих технологий позволяют эффективно проводить раннюю диагностику на клеточном и молекулярном уровнях, что составляет основу профилактического направления.

Для обеспечения самообразования врачей, претендующих на статус высокопрофессиональной когорты, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет издает научно-практический рецензируемый журнал «Клинико-лабораторный консилиум».

Это один из немногих научно-практических журналов междисциплинарного формата в системе непрерывного обучения врачей. И он достигает определенных успехов, как благодаря разнообразной тематике излагаемого материала, так и опираясь на сотрудничество с Международной федерацией клинической химии и лабораторной медицины.

Качество публикуемых материалов обеспечено авторитетной редакционной коллегией, состоящей из известных специалистов в различных направлениях клинической и лабораторной медицины.

В этом году журналу исполняется 10 лет!

От лица многочисленных читателей и членов Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики поздравляем с юбилеем и искренне желаем творческих успехов и здоровья авторам и читателям нашего профессионального журнала!

*Профессор кафедры клинической лабораторной диагностики  
Российской медицинской академии последипломного образования,  
Президент Российской ассоциации медицинской лабораторной  
диагностики,  
доктор медицинских наук, профессор*

*Д.Б. Сапрыгин*

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА  
«КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ»**

- Антонова И.Н.,** д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  
**Карпишенко А.И.,** д. м. н., профессор, СПб ГУЗ МИАЦ
- Афанасьев Б.В.,** д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  
**Ларионова В.И.,** д. м. н., профессор, в. н. с. ФГБУ «НИДОИ им. Г.И. Турнера» Минздравсоцразвития России
- Вавилова Т.В.,** д. м. н., СЗГМУ имени И. И. Мечникова, СПб  
**Леоэнов Д.А.,** д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
- Власов Т.Д.,** д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  
**Матвеев С.В.,** д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
- Жлоба А.А.,** д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  
**Смирнов А.В.,** д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
- Звартау Э.Э.,** д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  
**Сухоруков В.С.,** д. м. н., профессор, НИЛ общей патологии НИИ педиатрии и детской хирургии РАМН (Москва)
- Зыбина Н.Н.,** д. б. н., профессор, ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС (Санкт-Петербург)  
**Хоровская Л.А.,** д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
- Зуева Е.Е.,** д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  
**Чухловин А.Б.,** д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
- Эмануэль В.А.,** д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  
**Ягмуров О.Д.,** д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ ЖУРНАЛА  
«КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ»**

- Айламазян Э.А.,** академик РАМН, д. м. н., профессор, з. д. н. РФ, НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН (Санкт-Петербург)  
**Сапрыгин Д.Б.,** д. м. н., профессор, РМАПО (Москва)
- Дидур М.Д.,** д. м. н., профессор, ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН (Санкт-Петербург)  
**Соколовский Е.В.,** д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
- Дубина М.В.,** член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор, СПбФТНОЦ РАН  
**Стивен Хау Ян Вонг,** Ph. D., DABCC (TC), FACS, председатель секции протеомики и молекулярной патологии AACCC (США)
- Дюк В.А.,** д. т. н., профессор, СПИИРАН (Санкт-Петербург)  
**Бринкманн Т.,** адъюнкт-профессор клинической биохимии медицинского факультета Университета Рура в Бохуме (Германия)
- Калнер Андерс,** д. м. н., профессор, Каролинский госпиталь (Стокгольм, Швеция)  
**Цыган В.Н.,** д. м. н., профессор, член-корреспондент РАЕН, ВМА им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург)
- Мазуров В.И.,** академик РАМН, д. м. н., профессор, з. д. н. РФ, СЗГМУ имени И. И. Мечникова (Санкт-Петербург)  
**Шляхто Е.В.,** академик РАМН, д. м. н., профессор, з. д. н. РФ, ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» (Санкт-Петербург)
- Петришев Н.Н.,** д. м. н., профессор, академик МАНВШ, академик РАЕН, з. д. н. РФ, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова

ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО .....	1
РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ, РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ .....	2
<b>МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ «ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАЛОГА ЛАБОРАТОРИИ И КЛИНИЦИСТА» 4–5 ИЮНЯ 2012 Г., САНКТ-ПЕТЕРБУРГ</b>	
<b>ПРОБЛЕМЫ ОБРАЗОВАНИЯ, СТАНДАРТИЗАЦИИ И МЕТРОЛОГИИ В ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЕ</b>	
<i>Т.И. Долгих</i> ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ В УСЛОВИЯХ МОДЕРНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ .....	4
<i>В.И. Суворов, Л.А. Конопелько, В.Н. Кустова</i> ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ МЕТРОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЕ .....	7
<i>Ю.В. Первушин, В.П. Бондарева, В.Н. Иванова, С.Ш. Рогова</i> ИЗУЧЕНИЕ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВРАЧАМИ РАЗЛИЧНЫХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ — ОСНОВА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ДИАЛОГА ЛАБОРАТОРИИ И КЛИНИЦИСТА .....	18
<i>М.И. Зарайский</i> КОНФЕРЕНЦИЯ «ОБРАЗОВАНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЕ» .....	21
<b>ДИАБЕТ — ПРОБЛЕМА ВЕКА: ПУТИ РЕШЕНИЯ</b>	
<i>В.Н. Титов</i> ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И ПАТОГЕНЕЗ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНСУЛИНУ: ИНСУЛИН, ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, ГЛЮКОЗА И МИТОХОНДРИИ .....	23
<i>В.И. Один</i> ПРОБЛЕМА САХАРНОГО ДИАБЕТА С ПОЗИЦИИ ОНТОГЕНЕЗА .....	33
<i>А.В. Багаев</i> АВТОМАТИЗИРОВАННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕМОГЛОБИНА, ВЫБОР МЕТОДА .....	38
<b>МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ</b>	
<i>В.С. Сухоруков</i> ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ .....	41
<i>М.А. Булатникова, О.А. Кузнецова, К.Г. Буслов, В.И. Ларионова</i> КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ НЕЙРОНАЛЬНОГО ЛИПОФУСЦИНОЗА 1-ГО ТИПА (СИНДРОМА САНТАВУОРИ-ХАЛТИА) .....	48
<i>М.В. Иванченко</i> ОРФАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ .....	53
<b>ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА В ОБЛАСТИ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ</b>	
<i>В.В. Вельков</i> ПРЕСЕПСИН — НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ БИОМАРКЕР СЕПСИСА .....	56
<i>А.Б. Чухловин, С.Н. Ширяев, В.Н. Вавилов, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев</i> РЕАКТИВАЦИЯ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ВОЗРАСТА И ИНТЕНСИВНОСТИ КОНДИЦИОНИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ .....	63
<i>В.Н. Цыган, И.А. Сухина, В.Ю. Никитин, А.М. Иванов, Ю.В. Никитин</i> ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЗРЕЛЫХ Т- И НК-КЛЕТОЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ .....	68
<b>ИНФОРМАЦИЯ</b>	
ЦИКЛЫ ТЕМАТИЧЕСКОГО УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВРАЧЕЙ И СРЕДНИХ МЕДРАБОТНИКОВ НА ФАКУЛЬТЕТЕ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБУЧЕНИЯ .....	20
ТЕСТ INNOVANCE® VWF AC: ВЫСОКОСТАБИЛЬНЫЙ, ВЫСОКОТОЧНЫЙ И НАДЕЖНЫЙ .....	77
КАК ВЗВЕСИТЬ ВИРУС: «НАНОВЕСЫ»? .....	80
ПРИЗНАКИ КВАЛИФИКАЦИИ, ИЛИ «...СЕРВИСНОГО ИНЖЕНЕРА ВЫЗЫВАЛИ?» .....	82
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ, НАПРАВЛЯЮЩИХ МАТЕРИАЛЫ В РЕДАКЦИЮ .....	84

## ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ В УСЛОВИЯХ МОДЕРНИЗАЦИИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Т.И. ДОЛГИХ

Центральная научно-исследовательская лаборатория и Академический центр лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии, г. Омск

**Резюме.** Освещены основные проблемы лабораторной службы в условиях централизации исследований: обеспечение качества оказания медицинской помощи и контроль за ним, преаналитический этап, метрологический контроль, биологическая безопасность, взаимодействие лабораторной и клинической служб для корректной оценки лабораторных показателей, снижение риска профессиональных заболеваний медицинских работников и аттестация рабочих мест.

**Ключевые слова:** лабораторная медицина, преаналитика, качество исследований, профессиональная заболеваемость.

## PROBLEMS OF LABORATORY MEDICINE AND HEALTH CARE MODERNIZATION

T.I. DOLGICH

Central scientific research laboratory and academic center of laboratory diagnostics;  
State Budget educational institution of Higher professional education "Omsk state medical academy,  
Ministry for Health Care and Social Development", Omsk

**Resume.** This article reflects the most important problems of laboratory service that is used within the research: pre-analytic stage, control over the quality of medical care, metrological control, biological safeness, cooperation of laboratory and clinical services that helps to make correct estimate of laboratory data, declining the risk of professional diseases of those involved in medicine and attestation of working places.

**Key terms:** laboratory medicine, pre-analytics, quality of research, professional disease.

### Для корреспонденции:

Долгих Татьяна Ивановна — д. м. н., профессор,  
заведующая Центральной научно-исследовательской лабораторией и профессор  
кафедры клинической лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии;  
644001, г. Омск, ул. 20 лет РККА, д. 15.  
Тел. 8 (3812) 37-03-43, e-mail: dolgih-ti@mail.ru

Стратегия государства, направленная на модернизацию здравоохранения, диктует необходимость решения проблем лабораторной медицины как ключевого звена диагностического и лечебного процессов. В условиях централизации все большую значимость приобретают правильная организация работы лабораторной службы и компетенции персонала. Значительные финансовые вливания, направленные на переоснащение лабораторий, без регламента принятия административных решений на различных уровнях управления и уточнения перечня мероприятий по обеспечению вопросов безопасности и качества лабораторных исследований не приведут к ожидаемому медико-социальному и экономическому эффекту. Следует выделить следующие проблемы.

1. Проблема качества оказания медицинской помощи. Обеспечение качества (достоверности) лаборатор-

ных исследований следует проводить на всех этапах: преаналитическом (долабораторном и лабораторном), аналитическом, постаналитическом [1, 3]. Следует разработать регламент мероприятий по обеспечению качества исследований с учетом специфики и возможностей собственной лаборатории учреждения и степени централизации лабораторных исследований. В первую очередь речь идет о микробиологических, паразитологических, вирусологических и молекулярно-генетических исследованиях, которые проводятся в специализированных лабораториях. *Качество должно стать основополагающим принципом работы лаборатории.* Управление качеством предусматривает установление системы общих требований и правил их применения ко всем составляющим качества:

— применяемым технологиям (способам взятия биоматериала, методам исследования);

- используемым для их выполнения ресурсам (реагентам, калибровочным материалам, оборудованию);
- критериям и способам оценки аналитической надежности, клинической эффективности и соответствия результатов потребностям ведения пациентов.

Важная составляющая — интеграция и координация действий внутри медицинского учреждения или с внешними потребителями медицинской услуги

При организации работы *использование современных технологий взятия крови (вакуумные системы и вакуумные пробирки однократного применения) следует рассматривать как обязательную часть обеспечения качества оказания медицинской помощи*. До настоящего времени остается неясным вопрос: кто отвечает за преанализику на долабораторном этапе (забор материала, его хранение и доставка в лабораторию). При сохранении важной роли специалистов клинической лабораторной диагностики в обеспечении данного фрагмента работы, этот вопрос должен быть в компетенции заместителя главного врача по медицинской части и главной (старшей) медицинской сестры. Из практики должен быть исключен забор венозной крови шприцами с последующим переносом в стеклянные пробирки ввиду высокой частоты гемолиза и отсутствия стандартизации на этом этапе.

Самыми частыми ошибками при взятии крови с использованием вакуумных систем являются:

- неправильный выбор пробирок с соответствующей цветной маркировкой;
- отсутствие знаний по комплектности пробирок и необходимому (минимальному) объему крови для определенных исследований у маленьких детей и взрослых; рациональный подход позволит забирать оптимальный объем крови в необходимые пробирки (разного объема) с учетом возможности совмещения тестов (например, использование одной первичной пробирки для биохимических, гормональных и серологических исследований);
- заниженный объем крови (например, в пробирку на 8–9 мл с гелем либо без него забирают 1–2 мл крови из-за отсутствия пробирок малого объема);
- забор шприцем с последующим переносом крови в вакуумные пробирки, что, во-первых, повышает частоту гемолиза, а во-вторых, приводит к неадекватным результатам (например, при исследовании крови на стерильность выделить строгие анаэробы практически невозможно).

2. Первая проблема влечет за собой проблему *контроля за обеспечением качества*, подразумевающего систему критериев, позволяющих определить своевременность, *адекватность, полноту* и эффективность оказания медицинской помощи. Разработка интегрированных

систем менеджмента медицинского учреждения (лаборатории) в формате требований ГОСТ Р ИСО 9001 и ГОСТ Р ИСО 15189 может стать основополагающим документом [4].

3. Третьей проблемой является *обеспечение биологической безопасности*, которая реализуется в трех направлениях:

- безопасность пациента (*снижение риска заражения*);
- безопасность медицинского персонала (*снижение риска заражения*);
- безопасность окружающей среды.

4. *Проблема метрологического контроля*. Пока не решены следующие вопросы в плане реализации *ФЗ-102 «Об обеспечении единства измерений»* [2]: 1) Отсутствие готовности ЦСМ и др. организаций, имеющих лицензию на данный вид деятельности, к проведению поверки лабораторных автоматов, внесенных в Госреестр средств измерений; 2) Отсутствие государственных стандартных образцов (ГСО) для поверки анализаторов.

5. Подготовка кадров с ориентацией на «модель специалиста», что требует технически оснащенных учебных баз, обучения информационным технологиям, расширения тематических циклов.

6. *Консолидация научных кадров, специалистов в области лабораторной диагностики и врачей клинического профиля* для решения единых задач и продвижения новых технологий и методов в практику с оценкой эффективности внедрения.

7. Проблемы *корректной оценки лабораторных показателей* [5, 6]. Это следует продемонстрировать в отношении уровня гликированного гемоглобина крови с учетом Консенсуса совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов, который принял решение, что *«основным ориентиром в выборе стратегии лечения пациентов с СД2 является уровень гликированного гемоглобина HbA1c»*. Для определения HbA1c следует использовать сертифицированный метод в соответствии с National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) или International Federation of Clinical Chemists (IFCC) и стандартизованный в соответствии с референсными значениями, принятыми в Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). К таким методам относятся высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и капиллярный электрофорез. С учетом вышесказанного следует рационально организовать работу в учреждении первичного звена (первый уровень диагностики с учетом доступности теста для населения, возможностей собственной лаборатории для скрининга населения с использованием рутинных методов) и второго уровня (референс-исследования).



8. Следующая проблема — *снижение риска профессиональных заболеваний медицинских работников и аттестация рабочих мест*. Важным документом являются методические рекомендации МР 2.2.9.2242-07 «Гигиенические и эпидемиологические требования к условиям труда медицинских работников, выполняющих работы, связанные с риском возникновения инфекционных заболеваний». Данный документ внедрен на территории Омской области в 2009 г. (Акт внедрения службы Роспотребнадзора). Пункт 2.2.9. «Состояние здоровья работающих в связи с состоянием производственной среды» гласит:

5.6.1. Для профилактики инфекций с парентеральным механизмом передачи при инвазивных манипуляциях необходимо использование медицинским персоналом безопасных методов работы, к которым относят:

- вакуумный забор венозной крови с помощью специальных пробирок, позволяющий избежать контакта медицинского персонала с кровью пациента, безопасный для сотрудников, производящих венепункцию, и для персонала клинических лабораторий, поскольку пробирки с кровью герметично упакованы;
- максимальное использование одноразового инструментария и расходных материалов;
- использование установок для автоматической обработки изделий медицинского назначения и эндоскопического оборудования.

Следует провести оценку мероприятий, направленных на снижение риска профессиональных заболеваний на отдельных этапах:

- I. Взятие биоматериала (крови) у пациента (*чаще — проблема государственных учреждений*);
- II. Транспортировка биоматериала внутри медицинского учреждения (*проблема крупных учреждений*) и в другие учреждения (*проблема централизации лабораторной службы и др.*);

- III. Лабораторный этап (новые технологии, автоматизация, локальные места безопасности);
- IV. Дезинфекция и утилизация медицинских отходов.

Аттестация рабочих мест представляет важную проблему ввиду негативного влияния биологического фактора, однако в настоящее время он исключен из списка вредных факторов. *Согласно «Руководству по гигиенической оценке факторов рабочей среды и трудового процесса. Критерии и классификация условий труда» (Р2.2.2006-05) данный фактор не подлежит измерению и является неустранимым. Вместе с тем, именно биологический фактор явился основанием для установления на государственном уровне комплекса защитных мероприятий в отношении медицинских работников.*

Таким образом, решение проблемных вопросов лабораторной медицины остается возможным только с включением административного ресурса, что весьма актуально в условиях модернизации здравоохранения.

#### Литература

1. Долгих Т.И. Организация работы в медицинских учреждениях по применению вакуумных систем взятия крови: проблемы на преаналитическом этапе // Справ. заведующего КДЛ. 2010; 2: 15–20.
2. Долгих Т.И. Проблемные вопросы организации работы лабораторий и метрологическое обеспечение аналитического процесса // Клиническая лабораторная диагностика. 2009; 8: 43–46.
3. Кишкун А.А. Современные технологии повышения качества и эффективности клинической лабораторной диагностики. М.: РАМЛД, 2005: 528.
4. Эмануэль А.В. Технология создания руководства по качеству для медицинской лаборатории в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 15189 и ГОСТ Р ИСО 9001 // Справ. заведующего КДЛ. 2011; 11: 57–68.
5. Evidence-based practice for point-of-care testing. AACCPress, 2006.
6. Price C.P., Christenson R.H. Evidence-based Laboratory medicine: from principles to outcomes. AACCPress. 2003: 279.

## ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ МЕТРОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЕ

**В.И. СУВОРОВ, Л.А. КОНОПЕЛЬКО, В.Н. КУСТОВА**  
ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева»

**Резюме.** Статья посвящена проблеме воспроизводимости измерений. Известно, что достоверность полученных при измерении результатов зависит не только от свойств тест-систем, их чувствительности и специфичности, правильности работы лаборатории, но также от правильности референтных стандартов и контрольных материалов, используемых в лаборатории. В приведённом обзоре обсуждаются возможные трудности лабораторной диагностики, а также попытки создания государственных референтных стандартов для лабораторной медицины.

**Ключевые слова:** воспроизводимость измерений, референтные стандарты, принципы организации контроля качества в лабораторной диагностике.

## PROBLEMS AND METHODS OF METROLOGY IN LABORATORY MEDICINE

**V.I. SUVOROV, L.A. KONOPELKO, V.N. KUSTOVA**  
All-Russia D.I. Mendeleev Scientific and Research Institute for Metrology (VNIIM)  
(FGUP "D.I. Mendeleev VNIIM")

**Summary.** The problems of traceability of measurements are considered in present review. It's known that significance of the measurement uncertainty results seriously depends not only on the properties of test-systems used, their sensitivity and specificity and correct work of laboratory, but also on the trueness of reference standards and control materials of use in laboratory. In present work we tried to discuss the measurement uncertainty of laboratory analyzes. Also the article shows the results of State reference standards creation for laboratory medicine.

**Key words:** uniformity of measurements, reference standard, measurement traceability, principles of organization of quality control of laboratory diagnosis.

### Данные для корреспонденции:

Суворов Владимир Иванович, руководитель лаборатории государственных эталонов в области электрохимических измерений, ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева», 190005, Россия, Санкт-Петербург, Московский пр., 19, e-mail: suvorov@b10.vniim.ru, тел.: 323-96-44, +7-911-234-00-97

Конопелько Леонид Алексеевич, руководитель отдела государственных эталонов в области физико-химических измерений, ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева», 190005, Россия, Санкт-Петербург, Московский пр., 19, e-mail: lkonop@b10.vniim.ru, тел.: 315-11-45

Кустова Виктория Николаевна, научный сотрудник лаборатории государственных эталонов в области электрохимических измерений, ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева», 190005, Россия, Санкт-Петербург, Московский пр., 19, e-mail: kvik@b10.vniim.ru, тел.: 323-96-44

Уже более двух лет в России действует ФЗ 102 «Об обеспечении единства измерений», в котором осуществление деятельности в области здравоохранения определено как сфера государственного регулирования обеспечения единства измерений. Выполнение норм Закона ставит перед лабораторной диагностикой задачу чрезвычайной сложности и важности: **оценку метрологической корректности результатов диагностических процедур.**

Несмотря на то, что главной проблемой для лабораторий любого уровня по-прежнему остается достовер-

ность результатов выполненных исследований и, как следствие, их диагностическая значимость, реального внедрения Закона так и не произошло. Одной из главных причин, по нашему мнению, является устоявшееся в среде медицинского сообщества крайне неверное представление о значении метрологии, сводящее все метрологические мероприятия либо к графику ведения поверки, либо к встрече с представителями Государственного контроля (надзора). Главная же задача метрологии — обеспечение достоверности любой информации, получаемой от технических устройств (в данном случае, как врачом,

так и пациентом), — не принимается во внимание. Необходимость обеспечения сопоставимости результатов, получаемых в различных учреждениях здравоохранения, обуславливает неизбежность выполнения требований ФЗ «Об обеспечении единства измерений» в лабораторной медицине, которые кратко можно сформулировать как обеспечение прослеживаемости результатов лабораторных анализов к эталонам SI (The International System of Units).

**Примечание 1.** Уместно вспомнить одно из положений Руководства для специалистов клинической лабораторной диагностики: «В последнее время концепцию “прослеживаемости измерений”, установленную для общей метрологии, активно переносят в область клинической лабораторной диагностики. Вероятнее всего, эта концепция, направленная на достижение сопоставимости результатов измерений, невзирая на метод, процедуру измерений (включая наборы реагентов) и лабораторию, где проводят рутинные анализы, стратегически одна из самых важных в процессе стандартизации лабораторных исследований» [1].

### Состояние лабораторной базы

В 2010–2011 гг. сотрудниками ВНИИМ им. Д.И. Менделеева совместно со службой Главного метролога Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга был проведен комплексный анализ состояния приборного парка в клинико-диагностических лабораториях Северо-Западного региона России [2]. Из проведенного анализа следует, что большинство биохимических и гематологических анализаторов были введены в эксплуатацию в 1994–2001 гг. Средний процент износа составляет около 50% (от 15 до 100%). Большая часть из них установлена в стационарах и диагностических центрах. Кроме того, возможности анализаторов не используются в полной мере. Среднее количество адаптированных методик исследований аналитов составляет от 8 до 10, без учёта технологических ёмкостей и возможностей аппаратуры. Объёмы исследований не выходят за пределы 3000–4000 анализов в месяц. Анализаторы представлены множественным количеством моделей, и большинство из них (например, анализатор MARS производства Южной Кореи) работают с частыми отказами. Широко используют так называемые «полуавтоматы» — «фильтровые» фотометры с микропроцессором, позволяющим производить расчет результатов и выводить их на дисплей или принтер прибора. К ним относятся анализаторы: “Nemascreen”, “Clot”, “Humalayzer-2000”, “Screen Master” фирмы Hospitex Diagnostix (Швейцария, Италия), “Clinitek” фирмы Bayer Diagnostix (Германия), ФП-901 фирмы Labsistems (Финляндия), “Miditron” фирмы Roche Diagnostix (Швейцария) и другие.

Ион-селективные анализаторы и анализаторы для определения газов крови также представлены множественным количеством моделей, зачастую морально устаревших. Для определения газов крови и электролитов используются

приборы следующих типов: Easy Lyte (США), Medica (США), AVL (Австрия), ABL (Дания), ACE (США), Microlyte (Финляндия) и ЭЦ-59 (Россия) и другие.

Эксплуатация данной разнородной группы анализаторов крайне сложна, возникают трудности в сравнении результатов анализов, выполненных в ЛПУ города.

В последние годы в результате выполнения президентской программы «Здоровье» улучшилось оснащение КДЛ Санкт-Петербурга и областных центров. Утверждены перечни базового оборудования для КДЛ разного уровня. В структуры здравоохранения стали поступать современные автоматизированные ИФА-анализаторы, приборы капиллярного электрофореза, системы проведения ДНК-диагностики, оборудование для проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления, газовой хроматографии. Но по-прежнему главной проблемой для лабораторий любого уровня является достоверность результатов выполненных исследований и, как следствие, их диагностическая значимость.

### Состояние медицинского оборудования в КДЛ

В настоящее время в учреждениях здравоохранения используется большое количество (в основном импортных) приборов и аппаратов, применение которых предполагает наличие нормированных характеристик; в соответствии с требованиями ФЗ-102 эти характеристики:

- должны быть известны и гарантированы (проконтролированы) при выпуске научно обоснованным, изложенным в нормативной документации способом (например, первичной поверкой),
- должны удовлетворять требованиям методики выполнения измерений (МВИ), если они используются как составная (инструментальная) часть МВИ,
- должны давать результат измерения в пределах допускаемых отклонений,
- должны контролироваться и поддерживаться в установленных границах по погрешности в лечебно-диагностическом процессе.

Находящиеся в учреждениях здравоохранения приборы нередко не удовлетворяют перечисленным требованиям:

- в эксплуатационной документации не приводятся метрологические характеристики, позволяющие оценить погрешность измерения по медицинскому показателю;
- контроль (первичный) если и проведен, то не по медицинскому показателю (что позволило бы оценить и соответственно сравнить погрешности результатов измерений), а по физическому (например, в оптических единицах);
- текущий контроль невозможно провести из-за отсутствия правильно нормированных характеристик (даже по физическому параметру) и из-за отсутствия аттестованных СО. Это при-



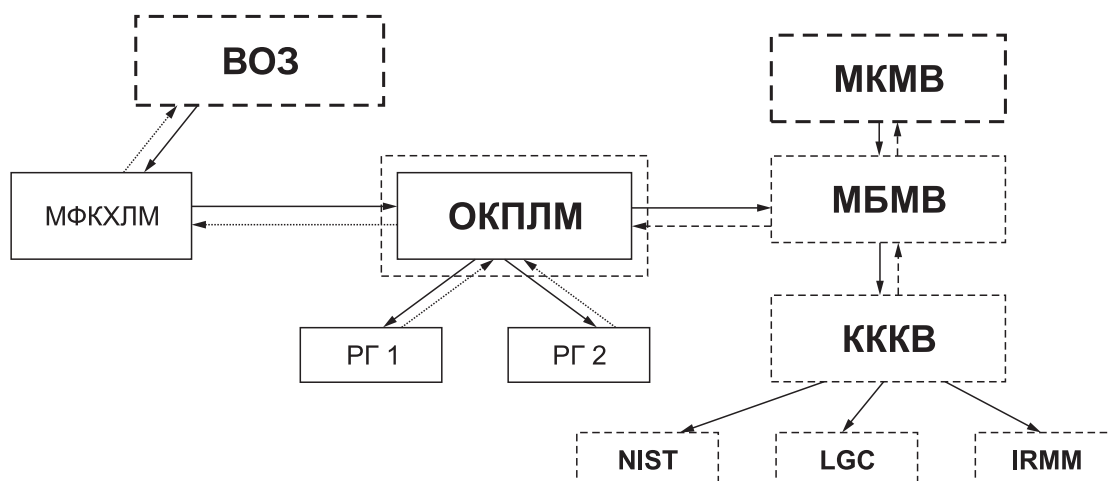


Рис. 1. Структура международной системы единства измерений в лабораторной медицине.

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения, МФКХЛМ (IFCC) – Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины, ОКПЛМ (JCTLM) – Объединенный комитет по прослеживаемости в лабораторной медицине, МКМВ – Международный комитет мер и весов, МБМВ – Международное бюро мер и весов (BIPM), КККВ – Консультативный комитет по количеству вещества (CCQM BIPM), NIST – Национальный институт стандартов и технологии США, НМИ, LGC – Национальный институт измерений, НМИ метрологии в химии и биологии, Великобритания, IRMM – Институт референтных материалов и измерений ЕС

водит к тому, что информация, поступающая к врачу по результатам измерений, не может быть оценена с точки зрения надежности и, соответственно, не может гарантировать надежность (правильность) принятия решения специалистом.

### Международный опыт

Необходимость обеспечения во всех областях деятельности, признаваемых на международном уровне, в том числе и в лабораторной медицине, прослеживаемых и сравниваемых измерений, а также эталонов и испытаний привела к созданию новых форм сотрудничества и взаимодействия международных и межправительственных организаций.

Так, Международным комитетом мер и весов подписаны Меморандумы о взаимопонимании со Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), Международной федерацией клинической химии и лабораторной медицины (МФКК) и Международной кооперацией по аккредитации лабораторий (ИЛАК) и т. д.

В свое время по инициативе МФКК, МБМВ и ИЛАК были начаты работы по новому направлению, связанному с прослеживаемостью в лабораторной медицине, в которых приняли участие представители организаций по оценке качества, изготовители стандартных образцов и ассоциации лабораторной диагностической индустрии стран Европейского Союза, Японии и Соединенных Штатов, а также законодательные органы этих стран. На рисунке 1 представлены взаимосвязи между участниками, составляющими структуру международной системы единства измерений в лабораторной медицине.

Главными участниками, обеспечивающими функционирование данной системы, являются: Международный комитет мер и весов, представляющий метрологию, Всемирная организация здравоохранения, представляющая медицину, Объединенный комитет по прослеживаемости в лабораторной медицине и национальные метрологические институты США и Великобритании, достигшие уровня международного значения.

Международным сообществом накоплен огромный научный и организационный потенциал обеспечения нормированной точности измерений путем создания эталонов – стандартных образцов и высокоточных аналитических технологий, рассматриваемых как составная часть т. н. референтной системы, то есть того, чего так не хватает отечественной медицине. При проведении большинства лабораторных исследований проводится калибровка соответствующего оборудования калибровочными материалами, которые являются носителями единиц измерения и имеют четкую «привязку» к национальным эталонам, основанную на концепции прослеживаемости к единицам SI.

Клиницисты развитых стран уже десять лет как поняли, что без взаимодействия с метрологами решить задачу оценки неопределенности измерений, т. е. не только погрешности анализатора, но погрешности (неопределенности) всего процесса количественной оценки аналитов в пробах без привязки к исходным эталонам не получится.

Центральное звено, обеспечивающее взаимодействие метрологов и клиницистов, – Международный комитет по прослеживаемости в лабораторной диагностике. В конце 1990-х годов международное метрологическое сообщество осознало, что лабораторная практика

развивается в отсутствие адекватной метрологической базы, вследствие чего в августе 2002 года при Международном комитете по мерам и весам (BIPM) по инициативе ряда общественных медицинских организаций (в том числе CIPM, IFCC, ILAC) был создан Объединенный комитет по прослеживаемости в лабораторной медицине (JCTLM).

Задачи, поставленные перед Комитетом, — это создание международной инфраструктуры в области клинических лабораторных исследований с акцентом на следующие вопросы:

- сравнимость, достоверность и эквивалентность результатов измерений в лабораторной медицине путем обеспечения концепции прослеживаемости,
- обеспечение связи между референтными лабораториями и национальными метрологическими институтами (НМИ),
- создание и координация системы референтных измерений, идентификация приоритетных видов измерений, подготовка к аккредитации референтных лабораторий.

Конечная цель при создании Комитета сформулирована в принятой Декларации о сотрудничестве **«Создание всемирной основы для обеспечения продвижения и руководства над международно признанными и принятыми эквивалентами мер в лабораторной медицине, а также прослеживаемостью к соответствующим измерительным стандартам».**

В своей деятельности Комитет руководствуется следующими документами:

- EN 12286:1998 + 12286/A1:2000; ISO 15193 In vitro diagnostic medical devices — Measurement of quantities in samples of biological origin — Presentation of reference measurement procedures;
- EN 12287:1999; ISO 15194 In vitro diagnostic medical devices — Measurement of quantities in samples of biological origin — Description of reference materials;
- prEN ISO/FDIS 15195 Laboratory Medicine — Requirements for reference measurement laboratories. Management system requirements. Technical requirements;
- ISO Guide 30: 1992;
- ISO 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories;
- ISO 17511 In vitro diagnostic medical devices — Measurement of Quantities in biological samples — Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials;
- ISO 18153 In vitro diagnostic medical devices — Measurement of Quantities in biological samples — Metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes.

Все последующие документы в области лабораторной медицины разрабатываются при непосредственном участии Комитета.

Непосредственная деятельность Комитета проводится в двух рабочих группах:

- WG1 Reference Materials and Reference Measurement Procedures,
- WG2 Reference Measurement Services.

К 2009 году рабочими группами принят ряд рекомендуемых документов, первичных методик и референтных образцов.

Рабочая группа WG1 опубликовала на сайте [www.bipm.org](http://www.bipm.org):

List 1 — (аналиты, значения которых прослеживаемы к SI: напр., электролиты, ферменты), в том числе:

- 100 референтных методик для 60 аналитов,
- 150 референтных материалов (SRM) для 95 аналитов, а также

List 2 — (аналиты, значения которых не прослеживаются к SI; напр.: нуклеиновые кислоты, факторы свертываемости и т.п.):

- 7 SRM для протеинов,
- 10 SRM для факторов свертываемости.

Перечень референтных материалов некоторых зарубежных фирм, рекомендуемых JCTLM WG 1, приведен в таблицах 1 и 2.

Рабочая группа WG2 опубликовала Руководящий документ “Process for requesting and processing nominations for JCTLM listing of reference measurement laboratory services”, а также ряд дополнительных документов по процедурам аттестации лабораторий в качестве референтных.

Национальные метрологические институты различных стран демонстрируют свои калибровочные и измерительные возможности, в т. ч. в областях, касающихся здравоохранения, публикацией на сайте BIPM в Приложении С по группе «Биологические жидкости и материалы» раздела метрологии «Количество вещества».

Некоторые примеры ключевых сличений КККВ, относящиеся к здравоохранению:

1. Ключевые сличения CCQM-K11 Глюкоза в сыворотке человека — проходили в 2001 г. Страны-участники: Корея (Korea Research Institute of Standards and Science), США (National Institute of Standards and Technology), Германия (Physikalisch-Technische Bundesanstalt). Результаты опубликованы 30 мая 2003 г. (Metrologia, 2003, 40, Tech. Suppl., 08003) и представлены в Приложении 9 (данные с сайта МБМВ).

Последующие ключевые сличения «Глюкоза и кальций в сыворотке человека» состоялись в 2005 и 2008 гг.

2. Ключевые сличения CCQM-K12 Креатинин в сыворотке — проходили в 2001 г. Страны-участники: ЕС (Institute for Reference Materials and Measurements, European Union), Корея (Korea Research Institute of Standards and Science), Англия (Laboratory of the Government Chemist, United Kingdom), США (National Institute of Standards and Technology), Германия (Physikalisch-Technische Bundesanstalt). Результаты

**Таблица 1. Перечень референтных материалов некоторых зарубежных фирм, рекомендуемых JCTLM WG 1**

Наименование	Обозначение
17b-estradiol human serum	BCR-576
a1-acid glycoprotein human serum	BCR-470 IRMM, Belgium
alpha-tocopherol lyophilized human serum	SRM 968c
amphetamine amphetamine HCl; neat NARL	CRM D736
antimony human urine	SRM 2670a
arginine aqueous solution	SRM 2389
ascorbic acid frozen human serum	SRM 970
aspartic acid aqueous solution	SRM 2389
benzoylecgonine human urine (lyophilized)	SRM 1511
benzoylecgonine human urine (lyophilized)	SRM 1508a
bilirubin crystalline material	SRM 916a
bovine serum albumina queous solution	SRM 927c
cadmium bovine blood	SRM 966
cadmium human blood	BCR-636 IRMM, Belgium
calcium human serum	BCR-304 IRMM, Belgium
Calcium human serum	SRM 909b

**Таблица 2. Перечень референтных материалов некоторых зарубежных фирм, рекомендуемых JCTLM WG 1**

Категория	Число выдвинутых на утверждение		Число рекомендованных к публикации	
	Референтные материалы	Референтные измерительные процедуры	Референтные материалы	Референтные измерительные процедуры
Газы, присутствующие в крови	1	1	0	0
Лекарства	84	5	23	3
Электролиты	70	23	29	23
Энзимы	20	7	11	6
Метаболиты и субстраты	69	44	39	35
Неэлектролитные металлы	43	50	30	15
Непептидные гормоны	15	26	14	22
Нуклеиновые кислоты	5	0	0	0
Витамины	8	2	7	0
Протеины	114	20	43	19
Группы крови	3	0	0	0
Показатель коагуляции	34	0	12	0
Микробиологическая серология	10	8	0	0
Другие	6	2	3	0
Общее число	482	188	211	123

опубликованы 30 июня 2003 г. (Metrologia, 2003, 40, Tech. Suppl., 08005) и представлены в Приложении 10 (данные с сайта МБМВ).

В таблице 3 приведены сличения последних пяти лет по исследованию ДНК.

Подтверждение нашей страной своих измерительных и калибровочных возможностей в области биоанализа на международном уровне в целом следует оценить как крайне неудачное. В текущем 2012 г. предстоят новые

сличения по анализам: глюкоза, холестерин, креатинин в сыворотке. Отступать больше некуда, будем надеяться на удачу.

#### Пути решения

Международный опыт представляется актуальным при создании (фактически отсутствующей на сегодняшний день) системы метрологического обеспечения лечебно-диагностического процесса в учреждениях здра-

Таблица 3. Сличение по исследованию ДНК

2008 г.	CCQM P53	Определение ДНК методом ПЦР
2009 г.	CCQM P58	Сопоставимость флуоресценции в ELISA
2010 г.	CCQM P113	Относительное количественное определение геномных фрагментов ДНК, выделенных из биологической ткани
2011 г.	CCQM K 61	Количественный анализ линеаризованной плазмидной ДНК, основанный на соответственных стандартах в матрице нецелевой ДНК

вохранения. Создаваемая система должна обеспечить единство измерений в лабораторной медицине и предсказуемость лечебных воздействий с погрешностями, установленными в соответствующей нормативной документации. Частично решение этой задачи предполагает внедрение системы ГОСТ 53131-2009 «Контроль качества клинических лабораторных исследований», в том числе Часть 1 «Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях».

Переломить ситуацию только путем закупки дорогостоящей зарубежной аналитической аппаратуры невозможно. Безусловной должна быть реализация всех требований JCTLM. В настоящее время это кажется крайне проблематичным, хотя на это направлены правительственные решения, в частности, «Соглашение о взаимодействии Федерального агентства «Ростехрегулирование» и Федеральной службы «Росздравнадзор» в области оценки соответствия, стандартизации, представления и получения информации (от 29.11.2005)». На это же нацелена Стратегия обеспечения единства измерений до 2015 года, принятая Правительством РФ [3]. В Стратегии прямо сказано: «...Проведение работ по метрологическому обеспечению учреждений здравоохранения, поверке средств измерений, применяемых в здравоохранении, оказывает существенное влияние на организацию деятельности учреждений здравоохранения. Существующие проблемы организации метрологического обеспечения, поверки и метрологического надзора за состоянием и применением средств измерений, применяемых в здравоохранении, требуют внимательного рассмотрения и решения...».

Решение указанных проблем предлагается в соответствии со следующими концептуальными подходами:

1. Средства измерений и стандартные образцы аттестуются в соответствии с НТД Росстандарта по физическому параметру.

2. Градуировка средств измерений проводится потребителем по контрольным материалам, являющимся вариантами стандартных образцов, и входит в процесс измерения.

3. Методики межлабораторных сравнений разрабатывают/принимают совместно два ведомства и утверждают в установленном порядке.

4. В рамках Федерального закона № 102 «Об обеспечении единства измерений» необходимо признание того, что для лабораторной медицины нужны стандартные образцы (калибраторы и контрольные материалы), основанные на биологической матрице, которые несут характер «вторичных стандартных образцов», поскольку имеют метод-зависимые значения концентрации аналитов. На начальном этапе необходимо ввиду отсутствия отечественных стандартных образцов аттестовать контрольные материалы импортного производства.

Для биохимических и гематологических стандартных образцов прослеживаемость результатов измерений к единицам системы SI может обеспечиваться двумя путями. Для стандартных образцов свойств (например, pH, удельная электропроводность, оптическая плотность и т. д.) требование прослеживаемости выполняется через их аттестацию с помощью соответствующих эталонов. Для стандартных образцов состава, в связи с отсутствием эталона количества вещества, прослеживаемость к SI осуществляется с помощью *первичных* методов (с помощью переходных коэффициентов, например, молярных масс, постоянной Фарадея или постоянной Авогадро, которые имеют оцененные неопределенности), а также косвенным способом:

- через другие методы, имеющие оцененные неопределенности;
- с помощью стандартных образцов, имеющих значения с оцененными неопределенностями.

Для большинства аналитов в биологической матрице (кровь, моча) за первичный метод принимается хромато-масс-спектрометрия с изотопным разбавлением. Стандартные образцы, аттестованные первичными методами, принимаются JCTLM как «первичные стандартные образцы», имеющие наивысшие метрологические характеристики. Для конкретных аналитов существуют различные методики первичных референтных измерений. В качестве примера в таблице 4 приведен перечень референтных методик, рекомендуемых JCTML WG2 для измерений содержания холестерина в крови пациента.

С конкретными методиками, определенными JCTLM для референтных национальных клинических лабораторий, можно ознакомиться на сайте института NIST [www.nist.gov](http://www.nist.gov) и на сайте BIPM [www.bipm.org](http://www.bipm.org).

Таблица 4 . Перечень рекомендуемых референтных методик для измерений содержания холестерина в крови пациента

Разработчик	Вид матрицы	Метод
NIST	Лиофилизированная или замороженная сыворотка	ГХ/МСИР
Университет Гента	Лиофилизированная или замороженная сыворотка	ГХ/МСИР
DGKC (Siekman)	Лиофилизированная или замороженная сыворотка	ГХ/МСИР
CDCAbel-Kendall	Лиофилизированная или замороженная сыворотка	Спектрофотометрия

Несмотря на существующее в стране развитое эталонное обеспечение, существует значительный контраст между разными отделами физико-химических измерений. Такое различие хорошо демонстрирует сравнительный анализ калибровочных и измерительных возможностей России (рис. 2).

Столь малая доля измерительных возможностей в здравоохранении объясняется прежде всего недоступностью отечественным лабораториям многих прогрессивных методов количественного анализа вещества со сложной матрицей, такого, как кровь. Ключевые сличения по измерению аналитов в сыворотке крови, в которых участвовала Россия (Са, глюкоза), показали, что для того, чтобы попасть в заданные нормы неопределенности, недостаточно оснастить лаборатории новыми биохимическими и гематологическими анализаторами. Необходима система медицинских лабораторий «высокого уровня», которые только и в состоянии обеспечить внедрение современных измерительных технологий, таких как хромато-масс-спектрометрия с изотопным разбавлением и римановская спектрометрия. Внедрение этих

технологий обеспечит не только требуемый уровень измерений аналитов, но и выпуск исходных стандартных образцов сыворотки крови, без которых сегодня невозможно метрологическое сопровождение изготовления.

В нашей стране принято и распространено на все диагностические лаборатории, обеспечивающие обслуживание населения, большинство стандартов ИСО. Проекты новых стандартов, напрямую касающиеся метрологической прослеживаемости, приведены в последнем справочном руководстве «Лабораторная диагностика России» под редакцией В.В. Меньшикова и А.А. Тоталаяна [5]. Процесс гармонизации отечественных стандартов для лабораторной медицины начался приказом Ростехрегулирования от 27 декабря 2006 года № 348-ст, которым утвержден и введен в действие с 1 января 2008 года ГОСТ Р ИСО 15189-2006. Этот национальный стандарт идентичен международному стандарту ИСО 15189:2003 «Лаборатории медицинские. Специальные требования к качеству и компетентности» (ISO 15189:2003 “Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence”). Целью этого стандарта явилось

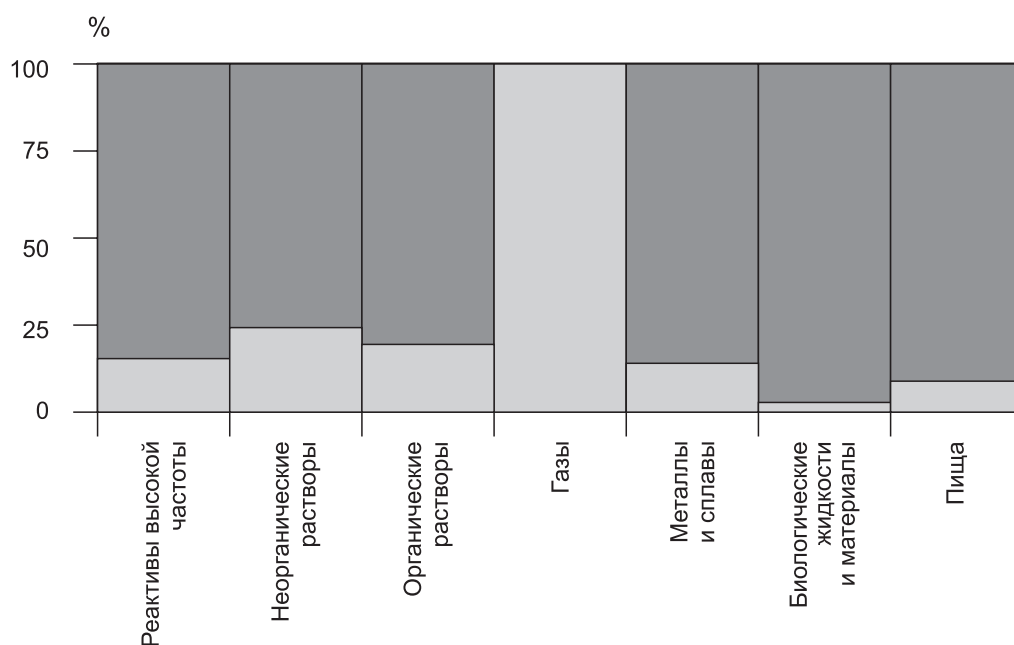


Рис. 2. Калибровочные и измерительные возможности высшей точности РФ в области физико-химических измерений в % от максимального уровня КИВ ведущих стран мира



формулирование тех минимальных требований к лабораториям, выполнение которых должно обеспечить как врача-клинициста, так и пациента результатами «с адекватной оценкой полученных результатов и вычислением неопределенности измерений по каждому аналиту». До внедрения этого стандарта в медицинскую практику европейским медикам и метрологами пришлось выполнить большую совместную работу, которую в России ещё предстоит совершить. Экономическая целесообразность заставила западных врачей-клиницистов обратиться к проблемам качества информации, получаемой от врачей-лаборантов.

**Примечание 2:**

1. Наблюдения, проведенные специалистами NIST совместно с одной из крупнейших клиник в США Mayo Clinic над 20 000 пациентов, показали, что смещение в результатах измерений холестерина всего лишь на 3–5% увеличивает ошибки в диагностировании до 10%, что, в свою очередь, приводит к многомиллиардным финансовым затратам.

2. По данным U.S. Government Accounting Office and College of American Pathologists: только в 1968 году финансовые затраты, связанные с ошибками в лабораторных анализах, составили около 100 млрд.

На сегодняшний день в области лабораторной медицины действует 21 международный стандарт, большая часть из которых уже внедрена в отечественную практику. Все отечественные стандарты гармонизированы с международными стандартами ISO (ГОСТ Р ИСО). Совокупность этих стандартов позволяет упорядочить процесс проведения лабораторных исследований, а также создать достаточный объем стандартных образцов и эталонов различного уровня для метрологического обеспечения лабораторной медицины. Все упомянутые стандарты ИСО являются основным звеном в ряду стандартов, являющихся доказательной базой Европейских директив, рекомендуемых для медицинской техники. Аналогичные отечественные стандарты после принятия соответствующих технических регламентов будут доказательной базой в части, касающейся метрологического обеспечения лабораторной техники.

**Примечание 3.** Подробный анализ нормативной базы лабораторной медицины, гармонизированной с международными нормами и правилами, рассмотрен в статье В.В. Меньшикова [6].

**Разработка стандартных образцов**

Первые шаги по пути встраивания отечественной медицинской метрологии в рамки JCTLM предполагают создание ряда стандартных образцов для биохимических и гематологических исследований. К настоящему времени разработаны, исследованы и внедрены следующие государственные стандартные образцы (ГСО):

1. **ГСО состава форменных элементов крови — гематологический контроль.** В соответствии с утвержден-

ными нормативными документами набор образцов предназначен для контроля метрологических характеристик полу- и автоматических анализаторов крови, в том числе при проведении испытаний с целью утверждения типа и при поверке, и имеет следующие метрологические характеристики:

- счетная концентрация эритроцитов в образце: от  $3,5 \cdot 10^{12}$  до  $3,5 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$  (норма), от  $2,0 \cdot 10^{12}$  до  $3,4 \cdot 10^{12} \text{ л}^{-1}$  (патология);
- счетная концентрация лейкоцитов в образце от  $4,0 \cdot 10^9$  до  $9,0 \cdot 10^9 \text{ л}^{-1}$  (норма), от  $2,5 \cdot 10^9$  до  $3,9 \cdot 10^9 \text{ л}^{-1}$  (патология);
- пределы допускаемой относительной погрешности аттестованного значения счетной концентрации эритроцитов:  $\pm 7\%$ ;
- пределы допускаемой относительной погрешности аттестованного значения счетной концентрации лейкоцитов:  $\pm 7\%$ .

Образцы представляют собой суспензию лейкоцитов и эритроцитов животных в плазме донорской крови.

2. **Стандартный образец состава ДНК сои** предназначен для калибровки и поверки биоанализаторов, реализующих метод полимеразной цепной реакции в реальном времени, а также контроль метрологических характеристик при проведении их испытаний, в том числе с целью утверждения типа. Стандартный образец представляет собой раствор ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2 (Roundup Ready® soybeans, Monsanto Company, США) в ДНК натуральной сои (ГОСТ 17109-88), расфасованный в пластиковые флаконы (Scientific Specialties Inc., кат. SSI-3320-00, США) объемом 0,5 мл с крышечкой.

3. **Стандартный образец массовой концентрации холестерина в крови** предназначен для контроля метрологических характеристик биохимических анализаторов крови, в том числе при проведении испытаний с целью утверждения типа и при поверке. Стандартный образец представляет собой лиофилизированную суспензию плазмы донорской крови.

4. **Стандартный образец глюкозы в крови**, предназначенный для контроля метрологических характеристик портативных глюкометров.

К перечисленным ГСО следует добавить ГСО содержания металлов в крови, разработанные Институтом токсикологии ФМБА.

**Новые вызовы**

Новые проблемы, стоящие перед лабораторной медициной и требующие новых разработок медицинских стандартов, сформулированы в рабочей программе ВРМ «Обзор дорожных карт и стратегий для биоизмерений. Исследование потребностей в измерительных услугах и сличениях для международной инфраструктуры для бионаук и биотехнологии», созданной на основе исследований метрологических институтов США, Великобритании, КНР и Бельгии.

В Программе отмечается: «*здравоохранение как сектор с самой большой неудовлетворенной потребностью в поддержке новых диагностических методов для раннего обнаружения болезни и персонализированной медицины и в поддержке открытия и разработки лекарств*». Как пример недостаточного развития метрологического обеспечения лабораторных исследований, приводятся данные по США: «70% медицинских решений основываются на результатах лабораторных исследований, пока только 10% из 700 самых обычных испытаний имеют международно признанные стандартные методы, поддерживающие их эффективность».

В Программе ВІРМ перечислены основные измерительные услуги, которые будут основой прослеживаемости в здравоохранении:

- In-vitro диагностические устройства и платформы для перекрестного анализа;
- Высокомультимплексный количественный анализ биологических проб;
- Следующее поколение секвенирования нуклеиновых кислот;
- Виды и примеси следового уровня в биопробах;
- Нынешняя технология IVD диагностики страдает от недостатка стандартных образцов. Сформулированы главные проблемы в создании стандартных образцов для биоанализа:
  - непептидные гормоны (серотонин, мелатонин, допамин);
  - протеины сыворотки (С-реактивный протеин);
  - нуклеиновые кислоты (число копий вируса, идентичность и количество микроРНК);
  - метаболиты (не менее 30: креатинин, глюкоза, витамины, жирные кислоты);

- Одна из главных проблем — растущее применение цифровых ручных систем “point-of-care” и, как следствие, сопоставимость с результатами клинико-диагностических лабораторий. Поддержка таких систем потребует реализации новых измерительных услуг и создания необходимых стандартных образцов (прежде всего: сенсор глюкозы, сердечная система Biosite), причем максимум через 3–5 лет;
- Детектирование низких концентраций конкретных последовательностей ДНК, связанных с болезнью, в присутствии огромного избытка «нормальной» ДНК;
- Новые системы “point-of-care” для быстрого прямого определения ДНК (принцип «черного ящика», включающий экстракцию пробы, амплификацию и анализ). Их использование, в свою очередь, потребует таких измерительных услуг, как:
  - микрочиповый анализ РНК и протеинов;
  - масс-спектрометрия протеинов,
  - хромато-масс-спектрометрия и ЯМР-спектрометрия метаболитов, валидация биомаркеров;
- Создание клинико-лабораторных геномных и генетических эталонов (CLGGS).

Из обзора дорожной карты следует, что главную задачу обеспечения достоверности современной диагностики международное сообщество видит в ускоренной разработке стандартных образцов для большинства значимых аналитов мочи, крови и других биологических жидкостей и тканей.

Правильность выбранного пути по метрологическому обеспечению медицинских исследований под-

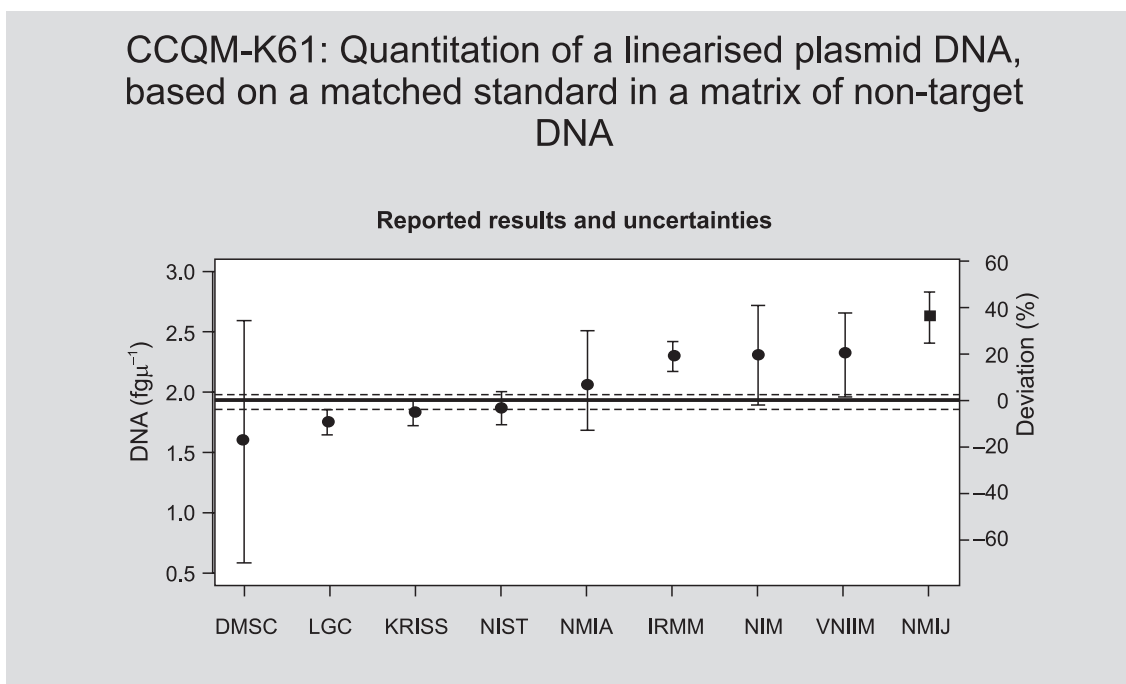


Рис. 3. Ключевые сличения CCQM-K61

тверждают безусловные успехи отечественной метрологии в анализе ДНК [3]. Совместные разработки ВНИИМ и Института цитологии РАН в создании ГСО привели к успешным ключевым сличениям ССQM К61 (рис. 3).

Опыт совместной работы по разработке ГСО для анализа ДНК показал, что только совместными усилиями метрологов и клиницистов можно достичь успехов в решении задач, стоящих перед лабораторной диагностикой. В целях эффективного взаимодействия Росстандарта и Росздравнадзора в области лабораторной медицины в Санкт-Петербурге на базе Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова создана межведомственная лаборатория медицинской метрологии в составе Научно-образовательного центра «Институт лабораторной медицины». В планах Центра разработка и обеспечение серийного выпуска ГСО основных аналитов, в частности: гемиглобинцианида, состава мочи, содержания глюкозы в сыворотке крови.

### Заключение

Создалась парадоксальная ситуация. С одной стороны, в стране действуют нормы и стандарты прослеживаемости в лабораторной диагностике, полностью отвечающие требованиям европейских директив и стандартов ИСО, а, с другой стороны, отмечается полное непонимание и бездействие большинства (если не сказать значительного большинства) в части их реализации. Да, конечно, есть организационные и финансовые трудности в реализации первичных методов, но полное неприятие естественного желания метрологов помочь в получении правильных результатов вызывает, скромно скажем, недоумение.

Хочется думать, что здравый смысл победит, тем более, что есть четкое понимание конкретных задач и путей их решения: освоение современных измерительных технологий, разработка номенклатуры стандартных образцов на основе сыворотки крови, создание сети референтных лабораторий международного уровня. А главное, руководителям отечественной лабораторной медицины необходимо понять, что метрология является ключом в обеспечении диагностики правильными результатами.

Для внедрения данных стандартов необходимо создание в стране цепочки прослеживаемости в лабораторной медицине. Для этого следует использовать апробированные зарубежными странами методические материалы, разработанные Объединенным комитетом по прослеживаемости в лабораторной медицине (JCTLM) совместно с Консультативным комитетом по количеству вещества (ССQM).

### Литература

1. Мошкин А.В., Долгов В.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике: Практ. руковод. М.: Медиздат, 2004: 216.
2. Отчет по НИР «Анализ состояния метрологического обеспечения средств измерений медицинского назначения в Северо-Запад-

ном регионе и разработка рекомендаций по совершенствованию методов и средств поверки». СПб.: ФГУП «ВНИИМ им. Д.И. Менделеева», 2010: 278.

3. Стратегия обеспечения единства измерений в России до 2015 г., утверждена приказом Министерства промышленности и торговли России № 529 от 17.06.2009 г.

4. Development of Definitive Methods for the National Reference System for the Clinical Laboratory, Approved Guideline NCCLS Publication NRSLC 1-4, National Committee for Clinical Laboratory Standards, PA (1991).

5. Лабораторная диагностика России. 2008/2009: Справочное руководство. / Под ред. В.В. Меньшикова, А.А. Тотоляна. М.: Медиздат, 2009.

6. Меньшиков В.В. Стандартизация в лабораторной медицине: цели, средства, внедрение: Справ. руковод. / Под ред. В.В. Меньшикова, А.А. Тотоляна. М.: Медиздат, 2009.

### Приложение 1

#### Перечень основополагающих стандартов при оценке качества в клинической лабораторной диагностике

1. ИСО 10993-12:2002 Биологическая оценка медицинских приборов. Часть 12: Подготовка проб и стандартных образцов.

2. ИСО 17593:2007 Клинические испытательные лаборатории и *in vitro* медицинские приборы. — Требования для систем *in vitro* мониторинга для самотестирования оральной антикоагуляционной терапии (в настоящее время находится в стадии принятия как ГОСТ Р).

3. ГОСТ Р ИСО 15189:2007 Медицинские лаборатории. — Частные требования по качеству и компетентности.

4. ИСО 15190:2003 Медицинские лаборатории. Требования для безопасности.

5. ГОСТ Р ИСО 151 93:2007 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в пробах биологической природы. Представление референсных методик выполнения измерений.

6. ГОСТ Р ИСО 15194:2007 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в пробах биологической природы. — Описание стандартных образцов.

7. ГОСТ Р ИСО 15195:2003 Лабораторная медицина. Требования к лабораторным референсным измерениям.

8. ИСО 15197:2003 *In vitro* диагностические испытательные системы. — Требования для систем контроля глюкозы крови для самотестирования для корректировки диабетического состояния (находится в стадии принятия как ГОСТ Р).

9. ИСО 15198:2004 Клиническая лабораторная медицина. *In vitro* диагностические медицинские приборы. Подтверждение процедур проверки качества для пользователя изготовителем.

10. ГОСТ Р ИСО 17511:2003 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам.

11. ИСО 18112:2006 Клинические испытательные лаборатории и *in vitro* медицинские приборы. *In vitro* диагностические приборы для профессионального использования. — Общие обязательные требования по представляемой изготовителем информации.

12. ГОСТ Р ИСО 18153:2003 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерения величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений каталитической концентрации ферментов, приписанных калибраторам и контрольным материалам.

13. ИСО 19001:2002 Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Представляемая изготовителем информация об окрашивании реагентов для *in vitro* диагностики в биологии.



14. ИСО 20776-1:2006 Клинические испытательные лаборатории и *in vitro* диагностические тест-системы. — Испытания восприимчивости к инфекционным объектам и оценки антибактериальной восприимчивости испытуемых приборов. Часть 1: Референсный метод испытаний *in vitro* активности антибактериальных объектов против быстрого роста аэробных бактерий, присутствующих в инфекционных болезнях.

15. ИСО 20776-2:2007 Клинические испытательные лаборатории и *in vitro* диагностические тест-системы. — Испытания восприимчивости к инфекционным объектам и оценки антибактериальной восприимчивости испытуемых приборов. Часть 2: Оценка антибактериальной восприимчивости испытуемых приборов.

16. ИСО 22869:2005 Медицинские лаборатории. — Руководство для лабораторий по применению ИСО 15189:2003.

17. ИСО 22870:2006 Передвижной пост. Требования к качеству и компетентности.

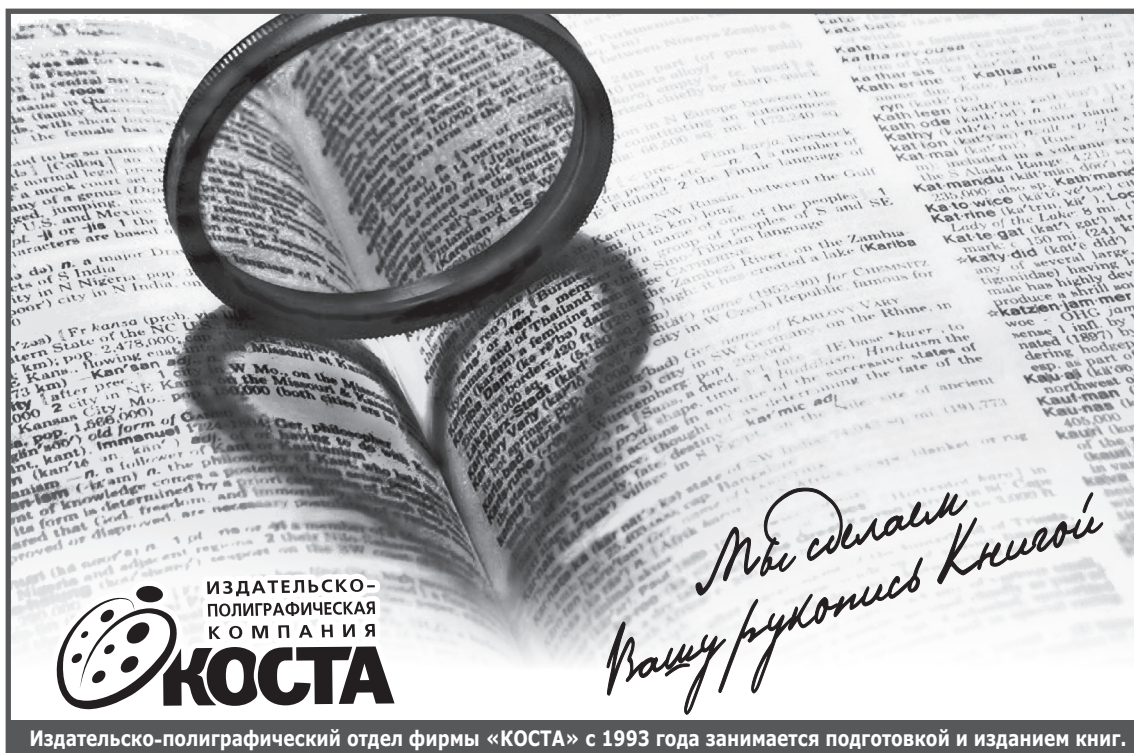
18. ГОСТ Р 53133.1-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований.

Часть 1. Пределы допускаемой погрешности результатов измерения аналитов в клиничко-диагностических лабораториях.

19. ГОСТ Р 53133.2-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрिलाбораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов.

20. ГОСТ Р 53133.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 3. Описание материалов для контроля качества клинических лабораторных исследований.

21. ГОСТ Р 53133.4-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила проведения клинического аудита эффективности лабораторного обеспечения деятельности медицинских организаций.



**ИЗДАТЕЛЬСКО-ПОЛИГРАФИЧЕСКАЯ КОМПАНИЯ КОСТА**

*Мы сделали Вашу рукопись Книгой!*

Издательско-полиграфический отдел фирмы «КОСТА» с 1993 года занимается подготовкой и изданием книг.

За эти годы мы приобрели большой опыт подготовки специальной, и в частности, медицинской литературы.

Среди подготовленных нами книг — работы в области кардиологии, неврологии, хирургии, генетики и других областях медицины.

Мы будем рады помочь Вам подготовить к печати юбилейный сборник, монографию, брошюру, методические рекомендации, автореферат.

Собственная полиграфическая база позволяет оперативно отпечатать любую полиграфическую продукцию.

Кроме того, наши дизайнеры разработают для Вас визитки, наклейки, рекламные листовки, обложки книг.

Не тратьте драгоценное время Ваших специалистов — приходите к нам.

**Сделать Вашу рукопись книгой — наша специальность.**

**Издательско-полиграфическая компания «КОСТА»  
(812) 445-10-02 [www.kostaprint.ru](http://www.kostaprint.ru)**

## ИЗУЧЕНИЕ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВРАЧАМИ РАЗЛИЧНЫХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ — ОСНОВА ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ДИАЛОГА ЛАБОРАТОРИИ И КЛИНИЦИСТА

Ю.В. ПЕРВУШИН<sup>1</sup>, В.П. БОНДАРЕВА<sup>1, 2</sup>, В.Н. ИВАНОВА<sup>1</sup>, С.Ш. РОГОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Кафедра клинической лабораторной диагностики Института последипломного и дополнительного образования ГБОУ ВПО

<sup>2</sup> Ставропольская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России, Министерство здравоохранения Ставропольского края

**Резюме.** Основой для оптимизации диалога лаборатории и клинициста может быть четко сформированная программа подготовки по лабораторной медицине, которая должна включать обязательное изучение специальности до получения диплома и постоянное последипломное совершенствование — различное, но обязательное для врачей разных специальностей.

**Ключевые слова:** клиническая лабораторная диагностика, подготовка специалистов, последипломная подготовка.

## MEDICAL PRACTITIONERS COMPETENCY IN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSIS: A BASIS FOR OPTIMIZATION OF DIALOGUE BETWEEN THE CLINICAL SPECIALIST AND SPECIALIST IN LABORATORY DIAGNOSIS

YU.V. PERVUSHIN<sup>1</sup>, V.P. BONDAREVA<sup>1, 2</sup>, V.N. IVANOVA<sup>1</sup>, S.SH. ROGOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Chair of clinical laboratory diagnosis; Institute of Postgraduate education Federal Budget Educational Institution of Higher Professional Education

<sup>2</sup> "Stavropol State Medical Academy" Ministry of Health Care and Social Development of Russian Federation, Ministry of Health Care of Stavropol District

**Summary.** Effective dialogue between the laboratory and clinical practitioners should be based on the adequate training program in laboratory medicine. This program should include obligatory laboratory medicine course at the level of undergraduate education and further postgraduate training. The postgraduate programs should be obligatory for all the clinical specialists but the content should depend on the basic specialization of the physician.

**Key words:** clinical laboratory diagnosis, specialists training, postgraduate education.

### Данные для корреспонденции:

Первушин Юрий Владиславович, кандидат медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики

Института последипломного и дополнительного образования

ГБОУ ВПО Ставропольская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России,

355017, г. Ставрополь, ул. Мира, 310,

тел.: (8652) 56-42-19, +7-9624-454-735, e-mail: pervushin60@gmail.com

Целью назначения и выполнения клинических лабораторных исследований является получение достоверной и своевременной лабораторной информации об изменениях состояния определенных физиологических систем и органов пациента, имеющих причинно-следственную связь с предполагаемым или развившимся патологическим процессом [1].

Возможности клинико-диагностических лабораторий учреждений здравоохранения в последние годы су-

щественно расширились. Произошло значительное улучшение материальной базы лабораторной медицины, связанное с национальным проектом «Здоровье» и модернизацией медицины. Однако это не всегда подкрепляется достаточной подготовкой врачей различных специальностей (ВРС) по клинической лабораторной диагностике. Выпускники вузов не имеют достаточных навыков анализировать результаты лабораторных исследований, сопоставлять их с клинической картиной



заболевания, применять для выставления диагноза, оценки тяжести состояния пациента и эффективности проводимой терапии. Недостаточная подготовка ВРС часто не позволяет полностью использовать все возможности поставляемого современного лабораторного оборудования и приводит к недостаточно эффективному его использованию.

Клинические лабораторные исследования являются общим делом клинического и лабораторного персонала. Разделение функций и ответственности между ними четко разграничено в ГОСТ Р 53079.3-2008. Однако практическая реализация положений этого документа во многом затруднена, так как до настоящего времени не сложилась стройная система подготовки ВРС по основам лабораторной медицины. В действующих образовательных стандартах дисциплина «клиническая лабораторная диагностика» отсутствует, хотя согласно приказу Минздравсоцразвития Российской Федерации № 210н от 23 апреля 2009 г. она относится к основным специальностям [2].

Первым этапом подготовки ВРС по лабораторной медицине должно быть обязательное введение соответствующей учебной дисциплины в образовательные стандарты для всех медицинских факультетов, выпускники которых могут далее становиться врачами клинической лабораторной диагностики. Клиническая лабораторная диагностика должна быть включена в основную программу подготовки студентов и в медицинских вузах созданы кафедры (курсы) клинической лабораторной диагностики. На этом этапе следует максимально использовать опыт кафедр, которые уже проводят подготовку студентов в разных вузах Российской Федерации, а также кафедр последипломного и дополнительного образования. Вопросы по клинической лабораторной диагностике обязательно должны быть включены в программу итоговой государственной аттестации. Отсутствие учебной дисциплины, итогового экзамена, кафедры, проводящей подготовку по учебной дисциплине, осуществляющей координацию преподавания предмета, приводит и будет приводить к отсутствию должного уровня знаний, умений, практических навыков и компетенций у выпускников вузов по лабораторной медицине.

На следующем этапе, этапе последипломного и дополнительного образования представляется важным изучение отдельных разделов лабораторной медицины на всех этапах подготовки ВРС (в клинической ординатуре, интернатуре, циклах общего и тематического усовершенствования). Для повышения мотивации обучения основам лабораторной медицины весьма целесообразно включение вопросов по клинической лабораторной диагностике в перечень знаний, умений, навыков, необходимых для аттестации ВРС и получения ими соответствующих категорий. Участие в работе аттестационных комиссий позволяет заключить, что ВРС нередко демонстрируют слабые знания вопросов лабораторной диагностики.

Создание программы поэтапного сквозного преподавания клинической лабораторной диагностики для ВРС на всех этапах обучения специалистов во многом решило бы проблемы подготовки по лабораторной медицине. Эта программа, или, правильнее, программы должны быть различными для ВРС и должны быть скорректированы в соответствии со стандартами оказания медицинской помощи пациентам.

Однако нельзя все проблемы взаимодействия клинического и лабораторного персонала свести только к подготовке врачей клиницистов. Важной является и подготовка специалистов по клинической лабораторной диагностике. В ней также имеется явный пробел, связанный с изучением основ лабораторной медицины в студенческий период, т. к. отсутствие основной базовой подготовки на ранних этапах формирования врача мешает дальнейшему выбору профессии. Нередко в лабораторию приходят врачи после неудачной попытки работать в других специальностях. Это приводит к тому, что вместо основного последипломного пути овладения лабораторной медициной — интернатура и/или клиническая ординатура, они проходят урезанный путь четырехмесячной переподготовки с естественным значительным снижением уровня знаний, умений и навыков.

Не добавил оптимизма и приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 541н от 23 июля 2010 г. «Об утверждении единого квалификационного справочника должностей руководителей, специалистов и служащих, раздел «Квалификационные характеристики должностей работников в сфере здравоохранения» [3]. В этом приказе в должностных обязанностях врача клинической лабораторной диагностики отсутствует врачебная составляющая работы специалиста лабораторной диагностики, его роль в диагностическом и лечебном процессе. По сути, согласно этому приказу роль врача клинической лабораторной диагностики в лаборатории практически такая же, как и роль биолога, и сводится к проведению аналитических процедур.

Нам представляется, что основой для оптимизации диалога лаборатории и клинициста может быть четко сформированная программа подготовки по лабораторной медицине, которая должна включать обязательное изучение специальности до получения диплома и постоянное последипломное совершенствование (различное для ВРС). Необходимо и включение вопросов по лабораторной диагностике в перечень обязательных при прохождении аттестации. Все эти меры являются надежной основой для повышения уровня обследования пациентов и оказания им качественной медицинской помощи на всех этапах проводимой терапии.

### Литература

1. ГОСТ Р 53079.3-2008. Правила взаимодействия персонала клинических подразделений и клиничко-диагностических лаборато-

рий медицинских организаций при выполнении клинических лабораторных исследований.

2. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 210н от 23 апреля 2009 г. «О номенклатуре специальностей специалистов с высшим и послевузовским медицинским и фармацевтическим образованием в сфере здравоохранения Российской Федерации».

3. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 541н от 23 июля 2010 г. «Об утверждении единого квалификационного справочника должностей руководителей, специалистов и служащих, раздел «Квалификационные характеристики должностей работников в сфере здравоохранения».



Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения и социального развития РФ  
Научно-образовательный Центр «Институт лабораторной медицины»  
197022 Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8. Тел./факс (812) 233-97-26, e-mail: 2339726@gmail.com

Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова приглашает на циклы тематического усовершенствования врачей и средних медицинских работников на факультете последипломного образования.

**Форма обучения:** очная — 72 часа; очно-заочная — 144 часа.

### 1. Управление качеством лабораторных исследований

**Категория слушателей:** управляющие по качеству, главные врачи, заведующие, врачи и биологи клинико-диагностических лабораторий.

**Основные вопросы:** Основы менеджмента качества в здравоохранении, общие вопросы управления качеством лабораторных исследований, руководство по качеству, качество преаналитического этапа, метрологические аспекты аналитического этапа, внутрिलाбораторный контроль качества, межлабораторные сравнения, системы внешней оценки качества, особенности контроля качества при различных лабораторных технологиях (ИФА, турбодиметрия и пр.), аспекты информативности в лабораторной медицине, лабораторные информационные системы.

Экономические аспекты обеспечения качества: технические задания на поставку оборудования, реагентов, калибраторов и расходных материалов, цена и себестоимость лабораторных исследований, аудитсинг.

Обзор и разбор основных стандартов: ИСО (ИСО 9001:2008, ИСО 13485:2003, ИСО 14971:2007), Директива 98/79/ЕС ин витро, СЕ маркировка изделий ин витро диагностики, законодательные требования ЕС, Гармонизация требований с директивами ЕС.

### 2. Лабораторная диагностика в трансфузиологии

**Категория слушателей:** врачи и биологи клинической лабораторной диагностики.

**Основные вопросы:** основы организации лабораторной службы, гематологические и биохимические исследования, лабораторная диагностика инфекций, иммуногематологические исследования антигенов эритроцитов, лабораторная диагностика ауто- и аллосенсибилизации к антигенам эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, обеспечение безопасности трансфузионной терапии, лабораторная диагностика гемолитической болезни, программы лабораторной диагностики причин посттрансфузионных осложнений, методы автоматизации иммуногематологических исследований.

Реализация Постановления Правительства № 1230 от 31.12.2010 г. «Об утверждении правил и методов исследований и правил отбора образцов донорской крови, необходимых для применения и исполнения технического регламента о требованиях

безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии».

### 3. Иммунодиагностика и мониторинг эффективности терапии в многопрофильной клинике. Проточная цитометрия в гематологии

**Категория слушателей:** заведующие, врачи и биологи клинико-диагностических лабораторий.

**Основные вопросы:** методы исследования в гематологии, организация гематологических и иммунологических исследований, гемобласты — диагностика, контроль терапии. Построение диагностического алгоритма с учетом аналитических характеристик методов исследований.

### 4. Лабораторные технологии в работе врача общей практики

**Категория слушателей:** врачи общей практики (семейная медицина), врачи различных клинических специальностей, врачи и биологи клинико-диагностических лабораторий.

**Основные вопросы:** клиническая лабораторная диагностика: чувствительность, специфичность, эффективность, информативность; особенности оценки различных биологических жидкостей; клинико-диагностическое значение исследования показателей системы гемостаза, лабораторный контроль антиагрегантной и антикоагулянтной терапии; алгоритм лабораторной диагностики заболеваний сердечно-сосудистой системы; мониторинг течения сахарного диабета; возможности лабораторной диагностики нарушений иммунной системы; алгоритмы лабораторной диагностики онкологических заболеваний, заболеваний почек, желудочно-кишечного тракта, легких, эндокринной системы, системы крови, системных заболеваний, лабораторное обеспечение диагностики и мониторинга терапии аллергических заболеваний. Построение диагностического алгоритма с учетом аналитических характеристик методов исследований. Формы организации лабораторной службы с учетом клинико-диагностических задач и объемов исследований, обеспечение

*Продолжение на стр. 37*

## КОНФЕРЕНЦИЯ «ОБРАЗОВАНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЕ»

**М.И. ЗАРАЙСКИЙ**

**ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России**

**Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины**

***Резюме.** С 17 по 19 марта 2012 года в Праге прошла конференция, посвященная вопросам обучения по специальности «Клиническая биохимия и клиническая лабораторная диагностика». В рамках конференции прошел эффективный обзор существующих систем образования в различных странах Евросоюза. Обсуждались вопросы продолжительности обучения, синхронизации учебных программ, формирования единой обучающей системы, включающей возможности стажировок, электронного интерактивного обучения и интернациональных принципов сертификации специалистов.*

***Ключевые слова:** образование, лабораторная медицина, поливалентность и моновалентность в образовании.*

## CONFERENCE "EDUCATION IN CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE"

**M.I. ZARAIISKI**

**Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education**

**"Saint-Petersburg State Pavlov Medical University", Ministry of Health Care and Social Development,**

**Chair of clinical laboratory diagnosis with the course of molecular medicine**

***Summary.** From 17 to 19 March 2012 in Prague the conference was held concerning the problems of specialists' education in clinical biochemistry and clinical laboratory diagnostics. In frames of the conference the effective review of existing systems of education in different Eurounion countries was given. The questions concerning the duration of education, synchronizing of educational programs, constructing of general educating system including possibility of fellowships, electronic interactive education and international principles of specialists certification were discussed.*

***Key words:** education, laboratory medicine, polyvalent and monovalent education.*

### **Данные для корреспонденции:**

*Зарайский Михаил Игоревич, д. м. н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8*

*Рабочий телефон: 2339726*

*e-mail: mzaraiski@yandex.ru*

В середине марта, с 17 по 19 число, в центре Европы, в красивейшем городе Чехии, Праге, состоялся симпозиум «Образование в клинической химии и лабораторной медицине».

Данный симпозиум проходил под патронажем Европейской Федерации клинической химии совместно с Чешским обществом клинической биохимии. Открыл симпозиум научный директор общества Томаш Зима (фото 1) с докладом об истории и современном состоянии в развитии и кооперации общества с подобными европейскими структурами. В частности, он сфокусировал внимание на том факте, что участники собрались в здании первого факультета медицины Карлового университета, который является старейшим медицинским факультетом (основан в 1348 году) Центральной Европы и крупнейшим университетом Чехии. В заключение он пожелал участникам «дружественной атмосферы и открытой дискуссии».

Основными участниками были представители стран Евросоюза — как преподаватели высших медицинских учебных заведений, так и представители европейских организаций, курирующих вопросы высшего специального образования.

При общей характеристике работы форума хотелось бы подчеркнуть, что все участники в качестве лейтмотива своих выступлений выбрали понятие «гармонизация». Причем гармонизация использовалась в самом широком смысле этого слова, от междисциплинарной преемственности в обучении до межгосударственных документов, регламентирующих процессы работы специалистов в лабораторной медицине.

Условно в программе симпозиума можно выделить несколько основных тем. Первый блок сообщений был посвящен докладам об организации обучения специалистов в области клинической лабораторной диагностики на всех стадиях учебного процесса в различных

странах Европы. Основным вопросом для обсуждения был следующий: моновалентным или поливалентным по образованию должен быть специалист по лабораторной медицине? Различия в решении этого вопроса определяются индивидуальными историческими, географическими и политическими условиями в каждой стране. Так, например, в Бельгии переход на исключительно поливалентное образование позволил сократить число лабораторий в стране с 2100 в 1979 году до около 200 в 2006 году. В Португалии также основную ставку делают на поливалентность в образовании, рассматривая моновалентность как этап «гиперспециализации» специалистов, имеющих базовое образование. Напротив, в Дании и Великобритании полагают, что специалист в лабораторной диагностике должен с самого начала обучения специализироваться по узкому лабораторному направлению. Компромиссная система обучения существует в Испании. Там готовят специалистов для работы в конкретном лечебном или научном учреждении. Причем, если выпускник планирует работать в небольшом госпитале на периферии, ему преподаются все дисциплины (гематология, цитология, генетика и т. д.). Для работы в крупных университетских клиниках готовят «узкопрофильного» специалиста. Несмотря на систему подготовки, был определен общий перечень дисциплин, которые необходимо знать любому специалисту в лабораторной медицине:

- Лабораторный менеджмент;
- Здоровье и безопасность;
- Межлабораторное взаимодействие;
- Качество / Аудит;
- Биоинформатика / Компьютерные технологии / Связь;
- Преаналитика;
- Постаналитика;
- Физиология / Физика / Химия / Биология.

Немаловажным вопросом для обсуждения был вопрос о продолжительности обучения. В большинстве стран Центральной Европы принята следующая схема обучения. Вначале специалисты проходят обучение



Фото 1. Томаш Зима, председатель конференции

в университете по теоретическим, общеклиническим и общелабораторным направлениям. После получения диплома об образовании они поступают на следующий этап обучения, где проходят специализацию по лабораторным технологиям. Продолжительность этого этапа составляет, например, от 4 лет в Ирландии до 7 лет в Бельгии. Подготовка специалиста в области биохимических наук и фармакологии занимает от 4 до 5 лет в медицинских и от 1 года до 3 лет в немедицинских учебных заведениях (например, Франция, Хорватия).

В некоторых странах, таких как Финляндия и Польша, подготовка лабораторного специалиста начинается с первого курса университета. Получение базового медицинского и лабораторного объема знаний занимает 5 лет, после чего в течение года выпускник работает в медицинских центрах на правах стажера. Специализация проводится в течение 4 лет на базе лаборатории университетского госпиталя, где изучаются узкие специальности: клиническая химия, гематология, эндокринология, фармакология, онкология, молекулярная генетика и т. д.

Немаловажным является тот факт, что в большинстве стран специалисты в области лабораторной медицины обучаются и основам проведения научного исследования, медицинской статистике, преподаванию специальности, а также методике проведения экзаменов.



## ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ И ПАТОГЕНЕЗ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНСУЛИНУ: ИНСУЛИН, ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, ГЛЮКОЗА И МИТОХОНДРИИ

В.Н. ТИТОВ

ФГБОУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс»  
Минздрава России, г. Москва

**Резюме.** Синдром резистентности к инсулину (ИНС) — неспособность филогенетически позднего ИНС обеспечить физиологичную реализацию биологической реакции экзотрофии (внешнего питания) в биологической функции питания (функции трофологии). ИНС не может 1) блокировать гидролиз триглицеридов в адипоцитах при активации его филогенетически более ранними гормонами; 2) предотвратить повышение в межклеточной среде содержания полярных незатерифицированных жирных кислот (ЖК); 3) блокировать пассивное поглощение клетками полярных ЖК путем диффузии через мембрану; 4) создать гиполлипидемию в цитозоле и 5) «принудить» митохондрии окислять глюкозу. Физико-химические условия на ранних ступенях филогенеза были таковы, что митохондрии при образовании АТФ последовательно окисляют: а) кетоновые тела; б) короткоцепочечные С 6–С 10 ЖК; в) среднецепочечные С 12 и С 14 ЖК; г) длинноцепочечную С 16:0 пальмитиновую ЖК; д) С 18:1 олеиновую моно-ЖК, которая имеет  $\Delta$ -9 двойную связь и высокую константу скорости окисления и е) глюкозу. Физиологично митохондрии окисляют глюкозу при условии, что в цитозоле нет ни одного субстрата с более высокой константой скорости реакции. Полагаем, так же действует филогенетически поздний ИНС на филогенетически ранний метаболизм глюкозы; он блокирует гидролиз триглицеридов и окисление ЖК, сводит к минимуму содержание в межклеточной среде и в цитозоле кетоновых тел, коротко-, средне- и длинноцепочечных ЖК. ИНС блокирует в адипоцитах гормонзависимую липазу (липазы), активность которой усиливают филогенетически ранние тиреоидные гормоны, соматотропный гормон, глюкокортикоиды, катехоламины и эстрогены. Филогенетически поздний ИНС может ингибировать липолиз, если секреция филогенетически более ранних гормонов не усилена. Структурно обусловленная резистентность к ИНС — это диабет второго типа. Любое по этиологии нарушение активного, рецепторного поглощения клетками ЖК в форме неполярных триглицеридов в составе липопротеинов очень низкой плотности компенсаторно усиливает пассивное поглощение ЖК в полярной форме путем пассивной диффузии через клеточную мембрану и останавливает окисление митохондриями глюкозы. В биологической реакции воспаления С-реактивный белок блокирует поглощение ИНС-зависимыми клетками липопротеинов очень низкой плотности и инициирует резистентность к ИНС. Диабет второго типа в пожилом возрасте — это симптом атеросклероза.

**Ключевые слова:** инсулин, пальмитиновая и олеиновая жирная кислота, липопротеины низкой плотности, резистентность к инсулину.

## AETHIOLOGICAL FACTORS AND PATHOGENESIS OF INSULIN RESISTANCE: INSULIN, FATTY ACIDS, GLUCOSE AND MITOCHONDRIAE

V.N. TITOV

Federal State Budget Educational Institution «Russian cardiological scientific-industrial complex»  
Ministry for Health care and social development of Russian Federation, Moscow

**Summary.** Insulin resistance syndrome is inability of phylogenetically late insulin to enable physiological realization of biologic reaction of exotrophy (external feeding) in biological function of feeding (function of trophology). Insulin is unable to: 1) block the hydrolysis of triglycerides in adipocytes while it is activated by phylogenetically earlier hormones; 2) prevent the increase in intracellular medium of polarized nonetherificated fatty acids; 3) block the passive influx of polarized fatty acids through cellular membranes; 4) cause hypolipidemia in cytozole; 5) make mitochondria to oxidize the glucose.

Physical and chemical conditions at early stages of phylogenesis lead to the fact that mitochondria during ATP synthesis are oxidizing subsequently a) ketonic bodies; b) chort chains C 6–C 10 fatty acids; c) medium chains C 12 u C 14 fatty acids d) long chain C 16:0 palmitin fatty acid; e) C 18:1 olein mono-fatty acid having  $\Delta$ -9 double bind and high constant of oxidation velocity and f) glucose. In physiological conditions mitochondriae oxidize glucose in case of on cytozole there are no substrates with higher constant of reaction velocity. We consider that phylogenetically late insulin acts on the early glucose metabolism in the same way. It blocks the hydrolysis of triglycerides and oxidation of fatty acids and minimizes the level in intracellular medium and cytozole of ketonic bodies, short-, medium- and long chain fatty acids. In adipocytes insulin blocks the hormone



*dependent lipase. Its activity is increased by phylogenetically early thyroid hormones, somatotrophic hormone, glucocorticosteroids, catecholamines and estrogens. Phylogenetically late insulin can inhibit lipolysis in case if secretion of phylogenetically earlier hormones is not increased. Structurally predisposed insulin resistance is related to second type of diabetes mellitus. Any disturbance of active receptor-mediated influx of fatty acids (in variant of non-polarized triglycerides in very low density lipoproteins) compensatory increases the passive influx of polarized fatty acids by passive diffusion through cellular membrane and stops glucose oxidation by mitochondria. In biological reaction of inflammation C-reactive protein blocks the consumption of very low density lipoproteins by insulin-dependent cells and initiates the insulin resistance. Second type of diabetes mellitus in elder age is the symptom of atherosclerosis.*

**Key words:** *insulin, palmitin and olein fatty acids, low density lipoproteins, insulin resistance.*

#### Данные для корреспонденции:

Титов Владимир Николаевич — доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории клинической биохимии липидов и липопротеинов ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития 122551, г. Москва, 3-я Черепковская ул. д. 15а  
Тел. 414-63-10; e-mail: vn\_titov@mail.ru

Инсулинорезистентность (ИР) определяют как «состояние, которое сопровождается сниженным поглощением глюкозы (ГЛЮ) тканями организма под влиянием инсулина (ИНС), т. е. это состояние организма, которое сопровождается резистентностью клеток различных органов и тканей к сахароснижающему действию ИНС» [1]. В литературе можно найти много вариантов объяснения происходящему *in vivo*, однако они не представляют единого целого, проясняя особенности становления отдельных симптомов ИР; сколько симптомов в синдроме ИР, столько и теорий [2]. Мы полагаем, что становление ИР обосновано рассматривать не как одну из форм заболеваний, а как физиологичный процесс общей биологии, с учетом того, что «любое биологическое исследование оказывается оправданным лишь в том случае, если оно имеет эволюционный выход» (Тимофеев-Рессовский А.Н.).

Согласно тому, что изложено нами ранее [3], филогенетически поздним (новым) регуляторным структурам трудно непосредственно (прямо) управлять *in vivo* клетками, которые способны воспринимать действие только филогенетически ранних гуморальных медиаторов. Поэтому новые (более поздние) функции с их иными медиаторами «надстраиваются» над более ранними. При нарушении реализации биологических функций и биологических реакций филогенетически более ранние системы регуляции могут функционально «заблокировать» филогенетически более поздние *in vivo*; это в полной мере относится и к действию гуморальных (гормональных) медиаторов. Частным проявлением этой биологической закономерности, которая сформировалась на разных, далеко отстоящих ступенях филогенеза, и является, мы полагаем, патогенез патофизиологичного синдрома ИР.

Синдром ИР — временная (или стойкая) неспособность филогенетически позднего ИНС обеспечить физиологичную реализацию биологической реакции экзотрофии (внешнего питания) в биологической функции

питания (функции трофологии). При синдроме ИР гормон не может: а) блокировать гидролиз триглицеридов (ТГ) в ИНС-зависимых клетках (адипоцитах и скелетных миоцитах) при патофизиологичном усилении активации гормонзависимой липазы филогенетически более ранними гуморальными медиаторами, гормонами; б) предотвратить повышение содержания полярных неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в комплексе с альбумином (АЛБ) как белком-переносчиком (НЭЖК + АЛБ) в межклеточной среде; в) блокировать поглощение клетками ЖК в форме полярных НЭЖК путем пассивной диффузии через плазматическую мембрану и г) «заставить» митохондрии окислять ГЛЮ.

Синтез и формирование системы ИНС произошло далеко не на ранних ступенях филогенеза. До ИНС миллионы лет метаболизм ГЛЮ в паракринных сообществах клеток регулировали: а) гликемия в межклеточной среде и б) глюкагон. Они вместе оказывали влияние на метаболизм ГЛЮ при реализации биологических функций питания (трофологии), функции гомеостаза и адаптации. Синтез ИНС произошел в ходе становления новой биологической функции — функции локомоции, функции движения [4]. Биологическая роль ИНС специфична и едина: гормон действует на уровне организма и биологически призван обеспечить энергией реализацию биологической функции локомоции. Она включает: а) сезонные перелеты, б) миграции в поисках пищи и продолжения вида, в) биологическую реакцию гибернации, г) погоню с целью добывания пищи и убежание при желании этой пищей не стать, а также д) функцию движения в периоды длительного голодания.

Однако для целей, за осуществление которых в филогенезе «отвечает» ИНС, глюкоза является далеко не оптимальным субстратом: а) энергоемкость ГЛЮ невысока; б) она выраженно гидрофильна, поэтому трудно сформировать активное поглощение ее клетками и в) нет возможности сформировать из ГЛЮ *in vivo* большие запасы гидрофильного гликогена. Поэтому ИНС все

свое «внимание» сосредоточил не на ГЛЮ, а на ЖК, которые реально являются *in vivo* в филогенезе оптимальными субстратом для запасания энергии. В силу этого филогенетически позднее действие ИНС направлено, в первую очередь, на регуляцию метаболизма ЖК. Имеются биологические основания и фактический материал, которые позволяют считать сахарный диабет нарушением, в первую очередь, метаболизма ЖК. В то же время, ЖК можно депонировать без ограничений в ИНС-зависимых, специализированных адипоцитах, дифференцировка которых произошла из клеток рыхлой соединительной ткани (РСТ). В этой ситуации ИНС начинает регулировать процессы метаболизма следующим образом: а) ГЛЮ, депонировать которую можно сугубо ограниченно, расходовать (окислить) в первую очередь, в то время как б) ЖК сохранить для реализации в последующем биологической функции локомоции.

Для этого ИНС: 1) инициирует формирование пула ИНС-зависимых клеток, которыми стали: а) скелетные, поперечнополосатые миоциты, б) кардиомиоциты, в) специализированные адипоциты — депо ЖК и г) перипортальные гепатоциты; 2) формирует рецепторы к ИНС и активированное (не активное) поглощение ГЛЮ через глюкозные транспортеры ГЛЮТ4 всеми ИНС-зависимыми клетками; 3) усиливает запасание в клетках ГЛЮ в форме гидрофильного гликогена; 4) активирует в гепатоцитах липогенез и превращение гидрофильной ГЛЮ в ее «гидрофобную» форму, которой стала С 16:0 пальмитиновая насыщенная ЖК (Пальм н-ЖК); 5) блокируя липолиз ТГ в ИНС-зависимых клетках, ИНС сводит к минимуму пассивное поглощение всеми клетками ЖК в форме полярных НЭЖК, понижает содержание их в цитозоле и б) «вынуждает» митохондрии ИНС-зависимых миоцитов окислять ГЛЮ. ИНС «старается» в первую очередь использовать экзогенную ГЛЮ пищи и сохранить *in vivo* как можно больше С 16:0 Пальм н-ЖК и олеиновую мононенасыщенную (моно-ЖК), как субстрат для реализации в дальнейшем биологической функции локомоции.

ИНС мало что сделал для совершенствования метаболизма ГЛЮ. ИНС сформировал не активное, а только активированное поглощение ГЛЮ через ГЛЮТ4 и только в ИНС-зависимых клетках. В то же время, ИНС много нововведений инициировал в метаболизме ЖК; 1) ИНС активировал биохимические реакции липогенеза — синтеза клетками из ГЛЮ Пальм н-ЖК — по существу «гидрофобной» формы ГЛЮ; 2) инициировал механизмы экспрессии генов и активацию ферментов липогенеза, включая активность пальмитоилэлонгазы и Δ9-стеароил-КоА десатуразы с целью превращения С 16:0 Пальм н-ЖК в ω-9 С 18:1 цис-олеиновую моно-ЖК и этерификацию их в состав олеиновых ТГ; 3) сформировал филогенетически самую позднюю систему липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) с целью переноса и активного поглощения клетками экзогенных и эндогенных ЖК (Пальм н-ЖК и олеиновой моно-ЖК)

в форме неполярных олеиновых ТГ, 4) инициировал синтез апоЕ и формирование апоЕ/В-100 рецепторного поглощения клетками Пальм н-ЖК и олеиновой моно-ЖК (субстратов для наработки клетками энергии) в форме олеиновых ТГ в составе олеиновых ЛПОНП. На какие бы аспекты действия ИНС, как регулятора метаболизма, мы не обратили бы внимание, все они направлены на совершенствование метаболизма ЖК и обеспечение реализации биологической функции локомоции.

В биологической функции трофологии, при чередовании биологических реакций экзотрофии (внешнего питания) и эндотрофии (внутреннего питания), действие ИНС проявляется только в реакции экзотрофии. Поэтому синдром ИР развивается в период постпрандиальной гипергликемии и гиперлипидемии; в период же реализации биологической реакции эндотрофии синтез ИНС понижается до базального уровня (рис. 1). Следовательно, можно обоснованно рассматривать сахарный диабет как нарушение метаболизма, в первую очередь, н-ЖК и моно-ЖК, ЛПОНП и во вторую — нарушение метаболизма ГЛЮ.

На ступенях филогенеза биологическую реакцию экзотрофии характеризуют: а) накопление *in vivo* «запасов» субстратов для наработки клетками энергии; б) субстратом, который физиологично окисляют митохондрии, является ГЛЮ; в) усиление пассивного поглощения ГЛЮ всеми клетками из межклеточной среды по градиенту концентрации, которое активирует гипергликемия межклеточной среды, и клетки усиленно поглощают ГЛЮ через ГЛЮТ1-ГЛЮТ3; г) усиление активированного поглощения ГЛЮ ИНС-зависимыми клетками при действии ИНС (гиперинсулинемии) через ГЛЮТ4 так же по градиенту концентрации межклеточная среда → цитозоль. Гипергликемия и ИНС — филогенетически два разных гуморальных «медиатора» со сходными, но не идентичными функциями. Можно говорить, что в биологической реакции экзотрофии, в условиях экзогенной гиперлипидемии и гипергликемии, при действии ИНС происходит запасание ЖК и расходование ГЛЮ.

Одновременно в биологической реакции эндотрофии, при отсутствии приема пищи, при нормогликемии в межклеточной среде и практически отсутствии ИНС митохондрии в физиологических условиях окисляют только «предпочитаемые» ЖК и происходит «экономия» ГЛЮ. Это определено и тем, что только ГЛЮ как субстрат для наработки энергии (АТФ) клетки могут использовать и в условиях гипоксии (реакции гликолиза в цитозоле) при низком парциальном давлении O<sub>2</sub> в межклеточной среде [5]. Без кислорода окисление ЖК в митохондриях происходить не может. ИНС далеко не в первую очередь «заботит» метаболизм ГЛЮ; ГЛЮ для ИНС функционально является вторичной. Только накопление ЖК является *in vivo* эффективным способом запасания энергии; при окислении одного г ЖК освобож-

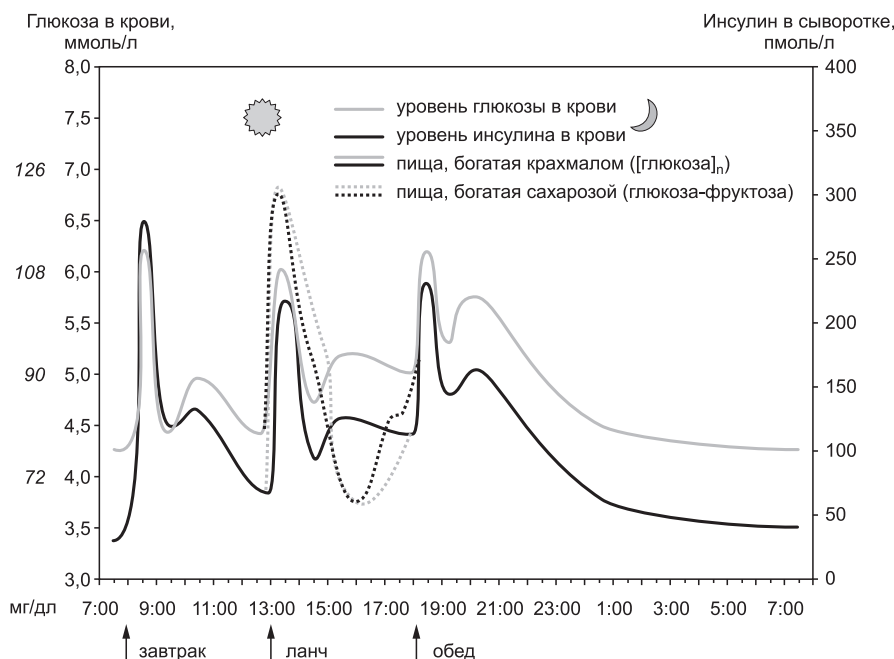


Рис. 1. Содержание ГЛЮ и ИНС в плазме крови в биологической реакции экзотрофии (постпрандиальная гипергликемия и гиперлипидемия) и в биологической реакции эндотрофии — вне приема пищи, ночью

дается больше энергии (9,3 ккал), чем при метаболизме одного г углеводов (3,7 ккал). Поскольку ЖК выражено гидрофобны, в жировой ткани нет воды; это обеспечивает почти девятикратную разницу в эффективности запасаения ЖК в форме ТГ, по сравнению с депонированием ГЛЮ в форме гликогена. У человека массой 70 кг энергетических запасов ЖК в форме ТГ достаточно для голодания в течение примерно 40 дней. Для запасаения такого же количества субстрата энергии в форме гликогена масса тела должна бы быть не менее 140 кг.

Становление в филогенезе функции клеточных органелл дает основание полагать, что митохондрии окисляют ГЛЮ только при условии, что в цитозоле клеток нет ни одного субстрата с большей константой скорости реакции, чем ГЛЮ.

ИНС блокирует в адипоцитах гормонзависимую липазу (липазы), активность которой усиливают филогенетически ранние тиреоидные гормоны [6], соматотропный гормон, глюкокортикоиды, катехоламины [7], эстрогены, а также филогенетически поздний натрий-уретической пептид [8]. ИНС может ингибировать липолиз в адипоцитах только в том случае, если секреция каждого из филогенетически более ранних гормонов и действие их на уровне паракринных сообществ клеток не усилены.

Рассмотрение становления в филогенезе биологических функций и биологических реакций выявляет существенное различие переноса ЖК (субстрата для окисления в митохондриях) в составе разных классов ЛП и поглощение их клетками до и после синтеза и начала действия ИНС.

1. В филогенезе в биологической функции трофологии, в реакции экзотрофии перенос ЖК первым стал обеспечивать апоА-I и ЛП высокой плотности (ЛПВП). Из ЛПВП клетки пассивно поглощали все ЖК — н-ЖК, моно-ЖК, эссенциальные ненасыщенные ЖК (ЭС нена-ЖК) и полиеновые ЖК (ЭС поли-ЖК), в форме полярных диглицеридов и фосфолипидов (ФЛ) путем диффузии через плазматическую мембрану. В биологической реакции эндотрофии клетки также пассивно поглощали ЖК из межклеточной среды в форме полярных НЭЖК из ассоциатов с АЛБ. В течение миллионов лет клетки поглощали все ЖК только путем пассивной диффузии через бислой липидов плазматической мембраны. Поскольку биологической функции локомоции еще не было, клеткам было достаточно того количества н-ЖК и моно-ЖК (субстратов для окисления в митохондриях и наработки энергии в форме АТФ), которое они пассивно, путем диффузии поглощали в форме полярных диглицеридов из ЛПВП.

2. Задолго до синтеза ИНС, на более поздних ступенях филогенеза относительно функции апоА-I и ЛПВП, *in vivo* клетки сформировали активное, рецепторное поглощение ЭСЖК (экзогенных): ими являются а) С 18:2 линолевая и С 18:3 линоленовая нена-ЖК и б) ω-3 С 20:5 эйкозапентаеновая (Эйкоза), ω-3 С 22:6 докозагексаеновая (Докоза) и ω-6 С 20:4 арахидоновая (Арахи) ЭС поли-ЖК. Для этого энтероциты стали синтезировать специфичный липид-переносящий белок аполипопротеин (апо) апоВ-48, а гепатоциты начали синтез в 2 раза большего белка с мол. массой 450 кДа — апоВ-100. АпоВ-48 в форме хиломикрон доставлял нена-ЖК от энтероцитов к гепатоцитам, а апоВ-100 переносил

нена-ЖК от гепатоцитов ко всем клеткам в форме ТГ в составе линолевых и линоленовых липопротеинов очень низкой (ЛПОНП) и низкой плотности (ЛПНП), которые клетки поглощали путем апоВ-100 рецепторного эндоцитоза.

3. На более поздних ступенях филогенеза, в процессе формирования биологической функции локомоции и системы ИНС, при образовании скелетной, поперечнополосатой мускулатуры резко возросли потребности в ЖК как субстрате для окисления в митохондриях и наработки АТФ, в н-ЖК и моно-ЖК. Это привело к тому, что при действии ИНС произошло формирование отдельного варианта переноса к клеткам н-ЖК+моно-ЖК в форме ТГ в составе апоВ-100 ЛП и активное, рецепторное поглощение их, в первую очередь, скелетными миоцитами. Для этого, можно полагать, ИНС инициировал синтез нового, филогенетически позднего апоЕ и специфичную систему ЛПОНП. В гепатоцитах апоВ-100 этерифицировал н-ЖК+моно-ЖК в состав пальмитиновых и олеиновых ТГ и структурировал их в состав пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП. После секреции в кровотока с ними связывается апоЕ, формирует кооперативный апоЕ/В-100 лиганд и миоциты поглощают пальмитиновые и олеиновые ЛПОНП в пределах гидратированной плотности, свойственной ЛПОНП, не затрагивая ЛПНП. Поэтому ЛПОНП и ЛПНП — это две филогенетически разные системы переноса к клеткам ЖК в форме неполярных ТГ: а) система линолевых и линоленовых ЛПОНП и далее ЛПНП переносит к клетками нена-ЖК и ЭС поли-ЖК, которые клетки используют как субстрат для формирования мембран клеток и синтеза биологически активных эйкозаноидов (простагландины, простагландины, тромбоксаны и лейкотриены; б) пальмитиновые и олеиновые только ЛПОНП, переносят к клеткам н-ЖК и моно-ЖК с целью окисления их в митохондриях до  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и синтеза АТФ в биохимических реакциях цикла Кребса. В физиологических условиях пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП не бывает в составе ЛПНП; это происходит только при патологии. Поэтому избыточное количество в пище Пальм н-ЖК, нарушение биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии является наиболее частой причиной формирования гиперлиппротеинемии у пациентов без синдрома ИР и сахарного диабета, вторичной гиперлиппротеинемии типа II б.

4. Частое сочетание синдрома ИР, диабета второго типа с гипертриглицеридемией и увеличением содержания в плазме крови пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП является следствием нарушения поглощения их скелетными миоцитами путем апоЕ/В-100 рецепторного эндоцитоза. Это определено: а) врожденными нарушениями метаболизма (мутации) белков при диабете второго типа и б) избыточной индукцией субстратом при чрезмерно высоком содержании в пище углеводов (ГЛЮ) в условиях синдрома ИР. В каждой ИНС-зави-

симой ткани синдром ИР проявляется в форме нарушения разных биохимических процессов. В печени это, главным образом, недостаточная экспрессия синтеза и активности стеароил-КоА десатуразы; это ключевой, ИНС-зависимый фермент липогенеза *in situ de novo*. Именно стеароил-КоА десатураза «отвечает» за то, в каком количестве гепатоциты будут синтезировать пальмитиновые и олеиновые ТГ и секретировать в кровотока пальмитиновые и олеиновые ЛПОНП.

5. Различия липогенеза в гепатоцитах в условиях физиологии и при диабете первого, второго типов и синдроме ИР состоит в том, что: а) в физиологических условиях питания и физической активности гепатоциты синтезируют преимущественно  $\omega$ -9 С 18:1 олеиновую моно-ЖК, этерифицируют ее в олеиновые ТГ и секретировать в кровотока в составе олеиновых ЛПОНП; б) при диабете и синдроме ИР в печени происходит синтез только С 16:0 Пальм н-ЖК, этерификация ее в пальмитиновые ТГ и секреция в кровь в форме пальмитиновых ЛПОНП. Физиологическими, олеиновыми ТГ являются олеил-олеил-олеат (ООО), олеил-олеил-пальмитат (ООП) и пальмитоил-олеил-пальмитат (ПОП). Одновременно при синдроме ИР и диабете второго типа, когда ИНС не активирует стеароил-КоА десатуразу, гепатоциты синтезируют пальмитиновые ТГ, являются пальмитоил-пальмитоил-пальмитат (ППП), пальмитоил-пальмитоил-олеат (ППО) и олеил-пальмитоил-олеат (ОПО). С наиболее высокой скоростью в составе ЛПОНП постгепариновая липопротеинлипаза гидролизует олеиновые ТГ, особенно ООО (триолеат); со значительно более низкой константой скорости реакции липаза в кровотоке гидролизует пальмитиновые ТГ. Если гепатоциты при высоком содержании в цитозоле Пальм н-ЖК «вынуждены» синтезировать такие ТГ как ППП (трипальмитат), который имеет температуру плавления  $48^\circ\text{C}$ , *in vivo* ТГ как ППП не может гидролизовать ни одна липаза, и они навсегда остаются в гепатоцитах. Так происходит, мы полагаем, формирование неалкогольной жировой болезни печени. Удалить ТГ как ППП можно только вместе с гепатоцитами, что и происходит на самом деле. При гибели гепатоцитов по типу апоптоза и формировании биологической реакции воспаления стеатоз постепенно превращается в стеатогепатит. Основой формирования неалкогольной жировой болезни печени в условиях синдрома ИР является низкая экспрессия ИНС активности стеароил-КоА десатуразы в гепатоцитах, когда только малое количество синтезированной *in situ* из глюкозы Пальм н-ЖК превращается в олеиновую моно-ЖК.

6. Чем больше гепатоциты формируют пальмитиновых ТГ и ЛПОНП, тем а) более длительной является постпрандиальная гипергликемия, б) больше пальмитиновых ЛПОНП при нарушенном гидролизе в них ТГ и поглощении их клетками путем апоЕ/В-100 эндоцитоза становятся по гидратированной плотности пальмитиновыми ЛПНП; в) больше формируется малых плотных



Таблица 1. Клинические состояния, которые сопровождается синдром резистентности к инсулину [1]

<p><i>Физиологические:</i> Пубертатный возраст Беременность Ночной сон Диета, богатая жирами</p>	<p><i>Эндокринная патология:</i> Тиреотоксикоз Гипотиреоз Синдром Кушинга Акромегалия Феохромоцитома</p>
<p><i>Патология метаболизма:</i> Диабет второго типа Декомпенсация диабета первого типа Диабетический кетоацидоз Ожирение Выраженная недостаточность питания Гиперурикемия Инсулиновая гипогликемия Избыточный прием алкоголя</p>	<p><i>Соматическая патология:</i> Эссенциальная гипертензия Хроническая почечная недостаточность Цирроз печени Ревматоидный артрит Онкологическая кахексия Сердечная недостаточность Миотоническая дистрофия Травмы и ожоги Хирургические вмешательства Сепсис</p>

ЛПНП; г) в большем мере нарушается поглощение клетками нена-ЖК и ЭС поли-ЖК в составе ЛПНП путем апоВ-100 эндоцитоза: происходит образование атероматоза в интима артерий эластического типа; параллельно повышению ХС-ЛПНП понижается уровень ХС-ЛПВП.

ИР — состояние, которое проявляется снижением чувствительности периферических тканей к биологическому действию ИНС и встречается не только при сахарном диабете второго типа, но и при других заболеваниях, сопровождая нарушения метаболизма [1] (табл. 1).

В этот перечень, можно дополнительно внести биологическую реакцию экзотрофии, постпрандиальную гиперлипидемию и гипергликемию после приема пищи, типы гиперлипидемий с гипертриглицеридемией [10]. Одновременно можно исключить ночной сон, в течение которого клетки реализуют только биологическую реакцию эндотрофии, при которой ИР физиологично не развивается. Не характерны симптомы ИР для гипотиреоза и «инсулиновой гипогликемии».

С позиций общей биологии и этиологии ИР (инсулинорезистентность) можно дифференцировать как а) функциональную и структурную, б) временную и длительно существующую, порой всю жизнь. Структурно обусловленные формы ИР — это сахарный диабет второго типа. Нарушения могут происходить: 1) в первичной структуре ИНС (редко) [11], его рецепторе, белках каскада передачи сигнала ИНС от рецептора в клетку к ГЛЮТ4 [12]; 2) в ГЛЮТ4 и белках, которые осуществляют выставление глюкозных транспортеров на мембрану и убирают их обратно в цитозоль и 3) в аполипептидах и ферментах, которые инициируют перенос н-ЖК+моно-ЖК в составе ЛПОНП и реализуют активное поглощение их клетками путем апоЕ/В-100 эндоцитоза.

Функциональная РЕЗ к ИНС формируется: 1) наиболее часто при афизиологичном составе ЖК в пище

(нарушение индукции субстратом); афизиологичные ЖК и афизиологичное количество Пальм н-ЖК, которое гепатоциты этерифицируют в состав ТГ, апоВ-100 переносит в ЛПОНП, а клетки активно поглощают путем апоЕ/В-100 эндоцитоза; 2) при гиперсекреции гормонов (гуморальных медиаторов), которые активируют в РСТ (в том числе и в адипоцитах) гормонзависимую липазу, усиливают гидролиз неполярных ТГ и повышают в межклеточной среде содержание полярных НЭЖК+АЛБ; 3) при нарушении биологической функции эндозологии («чистоты» межклеточной среды) при накоплении в ней эндогенных флогогенов (биологического «мусора» — инициаторов биологической реакции воспаления). «Мусором» являются: ферменты цитозоля, ЛП, не сформировавшие лиганд, комплексы антиген-антитело [13], тельца апоптоза, гликированные и пальмитоилированные протеины; все они, взаимодействуя с Толл-подобными рецепторами, активируют секрецию первичных и вторичных медиаторов биологической реакции воспаления [14], в том числе провоспалительных цитокинов и С-реактивного белка (СРБ). Повышение в плазме крови содержания СРБ, даже в субклиническом интервале (< 10 мг/л), инициирует условия для формирования ИР. Способны инициировать синдром ИР и алиментарный дефицит в пище и в клетках ЭС поли-ЖК или чрезмерное увеличение в пище Пальм н-ЖК. Последняя блокирует поглощение ЭС поли-ЖК клетками в составе ЛПНП, уменьшает содержание этих ЖК в аннулярных ФЛ плазматической мембраны и ингибирует функцию ГЛЮТ4.

Структурные нарушения в системе реализации действия ИНС на мембране и в цитозоле могут быть: а) первичными, врожденными, генетически обусловленными с развитием клинических проявлений диабета с раннего детского возраста [15] и б) вторичными, приобретенными, клиническими проявлениями диабета, которые развиваются с возрастом [16]; наиболее часто ИР сочетается с атеросклерозом и такими его симптомами как

атероматоз (толщина интима+медия), атеротромбоз и ишемическая болезнь сердца [17], а также с высоким уровнем ТГ и низкими величинами ХС-ЛПВП [18]. Не диабет второго типа часто является фактором риска, фоном для развития ишемической болезни сердца и коронарного атеросклероза [19], а синдром ИР, мы полагаем, это по сути симптом атеросклероза. Атеросклероз, по нашему мнению, является тоже патологией ЖК — это синдромом дефицита в клетках ЭС поли-ЖК [20]. ИР в пожилом возрасте — это симптом синдрома атеросклероза как гиперлиппротеинемия фенотипа II б, усиление агрегации тромбоцитов, повышение артериального давления. Последнее является биологической реакцией биологической функции эндоекологии — «замусоривание» межклеточной среды *in vivo* биологическим «мусором», эндогенными флогогенами малых размеров. В принципе, атеросклероз — нарушение метаболизма *in vivo*, главным образом, двух ЖК —  $\omega$ -6 С 20:4 Арахид ЭС поли-ЖК и эндогенной, афизиологичной,  $\omega$ -6 С 20:3 дигомо- $\gamma$ -линоленовой нена-ЖК. Сахарный диабет — это тоже нарушение метаболизма всего двух ЖК — Пальм н-ЖК и олеиновой моно-ЖК.

ГЛЮТ4 постоянно, конформационно (пространственно) изменяет формы, для чего и необходимо то место, которое между цепями ЭС поли-ЖК занимает вода [23]. Если ЭС поли-ЖК в ФЛ не будет, их место займут экзогенная  $\omega$ -6 С 18:3  $\gamma$ -линоленовая нена-ЖК и С 20:3 дигомо- $\gamma$ -линоленовая нена-ЖК. При этом цепи ЖК будут расположены плотно и пространства для конформации ГЛЮТ-4 станет недостаточно. При этом понизится функциональная активность ГЛЮТ4 в ИНС-зависимых клетках, как и всех иных ГЛЮТ, с ИР. И сколько не будет высока гликемия и концентрация ИНС в межклеточной среде, выставленные на мембрану ГЛЮТ4 будут функционировать с низкой производительностью. Это основная причина развития многолетней, выраженной ИР, частота которой увеличивается с возрастом и является, мы полагаем, одним из симптомов атеросклероза — синдрома внутриклеточного дефицита ЭС поли-ЖК.

Наследование сахарного диабета второго типа является полигенным; в качестве генов-кандидатов рассматривают: ген ИНС; ген рецептора к ГЛЮК; гены семейства белков, связывающих НЭЖК в цитозоле клеток; ген гликогенсинтазы; ген фосфатазы белков типа 1; гены ГЛЮТ2 и ГЛЮТ4; ген гексокиназы типа II; ген фосфатидил-3-инозитол киназы; ген промотора глюкозо-6-фосфатазы и ген промотора фосфоэнолпируваткарбоксилазы [1]. Если мутация одних генов ассоциирована с клиническими проявлениями диабета второго типа, то мутации иных генов длительное время остаются «молчащими», без клинических проявлений. И провоцирует такие «молчащие» мутации наиболее часто: а) афизиологично высокая индукция субстратами, переедание; б) избыток афизиологичных н-ЖК и углеводов и в) алиментарный дефицит в пище ЭС поли-ЖК. Частые му-

тации генов диабета второго типа удается выявлять в локальных популяциях с этническими особенностями жизни [21]. Как правило, проявления диабета второго типа определены развитием постоянного синдрома ИР.

Врожденные формы диабета развиваются с детства; это происходит у 16–18% больных. У подавляющего же числа пациентов с возрастом развивается ИР с формированием комбинированной гиперлипидемии фенотипа II б.

Внутривенное введение эмульсии с высоким содержанием ЭС поли-ЖК достоверно увеличивает жидкостность плазматической мембраны Т-лимфоцитов и повышает чувствительность клеток к ИНС [24]. У пациентов с диабетом, как первого, так и второго типа, так и при ИР, понижены параметры жидкостности плазматической мембраны клеток (эритроцитов), которую оценивают методом флуоресцентных зондов. Введение производных аминоксидина (бигуанидов) способно все эти нарушения нормализовать [25]. Использование жидкостной хроматографии и флуоресценции позволяет оценить жидкостность мембраны и сопоставить ее с ЖК. При диабете второго типа понижение жидкостности мембраны эритроцитов сопряжено с уменьшением содержания в ней Арахид ЭС поли-ЖК. Обращено внимание и на то, что расположение рецептора к ИНС и ГЛЮТ4 в плазматической мембране является выражено разным. Рецепторы к ИНС локализованы в области рафтов (плотов), участков мембраны, сформированных сфингомиелинами — ФЛ с наиболее высокой гидрофобностью и содержанием конденсированного между молекулами фосфолипидов ХС [26]. Микроокружение же ГЛЮТ4 состоит из наименее гидрофобных аминоксидов [27].

Снижение жидкостности и увеличение микровязкости плазматической мембраны ИНС-зависимых клеток [28], при низком содержании ЭС поли-ЖК в аминоксидинах, является наиболее частым условием формирования ИР [29]. Высокая микровязкость ФЛ затрудняет выставление на мембрану дополнительных ГЛЮТ4 [30], способствуя формированию синдрома ИР [31]. В условиях глобализации питания при высоком содержании в пище н-ЖК всегда формируется, мы полагаем, как алиментарный, так и эндогенный дефицит в клетках ЭС поли-ЖК. В этих условиях а) избыточное количество Пальм н-ЖК нарушает синтез ИНС и освобождение из  $\beta$ -клеток депонированного ИНС, а б) дефицит в клетках ЭС поли-ЖК не дает нормально функционировать ГЛЮТ4 [32], а также мешает осуществлять все основополагающие функции, включая биологические реакции эндоекологии, экзоцитоза и трансцитоза [33]. Для реализации этих биологических функций приходится *in vivo* задействовать биологическую реакцию гидродинамического, артериального давления и «продавливать» везикулы с биологическим «мусором» через мембрану и цитозоль клеток эндотелия.

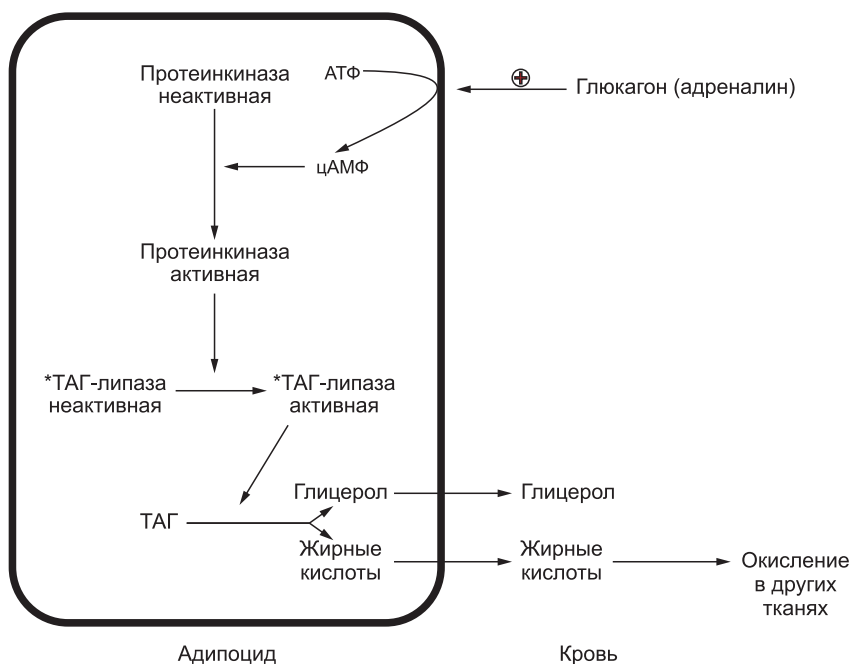


Рис. 2. Гуморальная регуляция активности гормонзависимой липазы, гидролиза ТГ в адипоцитах и мобилизации НЭЖК в биологической реакции эндотрофии. ТАГ – гормонзависимая триглицеридацилгидролаза адипоцитов

Формирование нейроэндокринной системы на ступенях филогенеза осуществлено, вероятно, на основе сигнальных молекул, которые информируют клетки или организм в целом об условиях внешней или внутренней среды; на ранних ступенях филогенеза все они оказывали свое действие на паракринном, муниципальном уровне. При становлении на ступенях филогенеза каждой из биологических функций они обзавелись собственными гуморальными медиаторами (гормонами), которые путем рецепторного действия усиливают снабжение пула клеток энергией, путем пассивного поглощения ими НЭЖК из межклеточной среды по градиенту концентрации. Поэтому с ранних ступней филогенеза липолиз во всех клетках, в том числе и освобождение НЭЖК для реализации биологической функции гомеостаза (а в эволюции и морфогенеза) осуществляют гормон роста и тиреоидные гормоны (рис. 2). Для реализации биологической функции адаптации липолиз активируют гуморальные медиаторы адреналин и глюкокортикоиды. Для продолжения вида гормонзависимые липазы во всех клетках и адипоцитах активируют эстрогены и иные репродуктивные гормональные начала, а также и локальные гормоны, которые синтезируют и секретируют сами клетки жировой ткани и действие которых мы еще до конца не поняли.

Обеспечение биологической функции локомоции, освобождение НЭЖК из адипоцитов в биологической реакции эндотрофии осуществляет иной, филогенетически более поздний, но также гуморальный медиатор, идентификация которого еще потребует усилий. Гормонзависимую липазу физической активности, как мы

ее назвали, характеризует: а) высокая константа скорости реакции – гидролиза ТГ в жировых клетках; б) отсутствие позиционной (стерической) специфичности липазы; в) фермент не делает различия между параметрами гидролиза олеиновых, пальмитиновых и линолевых в адипоцитах разных депо жировой ткани. Биологическую функцию адипонектинов и лептина, мы полагаем, еще следует установить [34].

В биологической функции эндоэкологии, биологической реакции воспаления основную роль в активации липолиза в адипоцитах и освобождения НЭЖК исполняют провоспалительные цитокины [35], в частности фактор некроза опухоли- $\alpha$ . СРБ же, мы полагаем, является липидпереносящим белком-вектором. СРБ циркулирует в плазме крови в форме мономера с мол. массой 25 кДа и в форме пентамера с мол. массой 125 кДа. СРБ-мономер является иммуномодулятором, в то время как СРБ-пентамер, по нашему мнению, это

белок-вектор направленного переноса Пальм н-ЖК и олеиновой моно-ЖК в форме ТГ в составе ЛПОИП как субстратов для наработки клетками энергии, синтеза АТФ. Основная масса СРБ-пентамера в межклеточной среде в физиологических условиях располагается на поверхности ЛПОИП [36]. Мы полагаем, что СРБ (рис. 3) является патофизиологичным, липидпереносящим белком острой фазы биологической реакции воспаления. СРБ активирует *in vivo* одновременно все клетки РСТ, которые реализуют биологическую реакцию воспаления путем усиленного снабжения их субстратами для выработки энергии – н-ЖК+моно-ЖК в форме неполярных ТГ в составе олеиновых ЛПОИП.

Синтезируют СРБ клетки паракринных сообществ, в которых развивается локальная биологическая реакция воспаления [37]. СРБ в кровотоке связывается с ЛПОИП, перекрывает их физиологичный апоЕ/В-100 лиганд, сам становится патофизиологичным лигандом и переадресует поток ЛПОИП и ЖК только к клеткам РСТ, которые непосредственно реализуют биологическую реакцию воспаления. В свою очередь, клетки РСТ выставляют на мембрану кооперативные рецепторы к СРБ, частью которых является белок-рецептор CD36 как транслокатор для ЖК. Миоциты, лишенные возможности активно поглощать ЖК в форме ТГ, вынуждены, используя биологическую функцию адаптации: а) инициировать усиление липолиза ТГ в адипоцитах при действии гормонов адаптации; б) повысить концентрацию НЭЖК+АЛБ в межклеточной среде и в) усилить пассивное поглощение миоцитами н-ЖК +моно-ЖК в форме НЭЖК из ассоциатов с АЛБ [38].

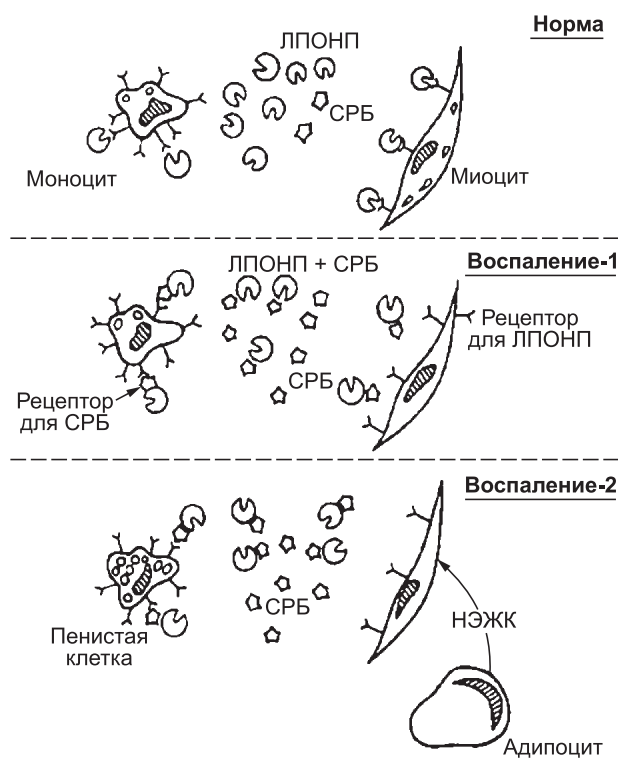


Рис. 3. Блокада СРБ активного рецепторного поглощения миоцитами н-ЖК + моно-ЖК в форме ТГ в ЛПОНП и активация пассивного поглощения н-ЖК+моно-ЖК в форме НЭЖК из ассоциатов с АЛБ

Вынужденная замена в патофизиологических условиях воспаления активного поглощения миоцитами ЖК в форме неполярных ТГ в составе ЛПОНП на пассивное поглощение — в форме полярных НЭЖК и есть причина ИР при любой по этиологии биологической реакции воспаления; при поступлении и наличии в цитозоле НЭЖК митохондрии останавливают окисление ГЛЮ. Поэтому а) приобретенное или врожденное нарушение активного поглощения ИНС-зависимыми клетками ЖК в форме ТГ, гипертриглицеридемия являются условиями формирования РЕЗ к ИНС. Пока в плазме крови повышено содержание СРБ, ИНС не сможет блокировать пассивное поглощение клетками НЭЖК, митохондрии не станут физиологично окислять ГЛЮ и будет продолжаться ИР. Полагают, что неалкогольная жировая болезнь печени и последующее развитие стеатогепатита являются следствием формирования синдрома ИР [39], в частности, недостаточной активации ИНС ключевого фермента  $\Delta^9$ -стеарил-КоА десатуразы, которая превращает Пальм н-ЖК в олеиновую моно-ЖК. Эффективными же средствами лечения этой патологии оказываются гиполипидемические препараты (тиазолиденидионы, фибраты и бигуаниды), которые обладают выраженным гиполипидемическим и гипогликемическим действием [40].

Что же происходит при полиэтиологичном синдроме ИР (инсулинорезистентности): а) блокада ли меха-

низмов действия ИНС на клетки («сигнал» не доходит) или б) клетки, при сохраненных механизмах действия, «игнорируют» гуморальные сигналы ИНС? Структурно обусловленная блокада действия ИНС является основой врожденного сахарного диабета второго типа. Функционально обусловленная блокада действия ИНС (низкая активность ГЛЮТ4) является основой и симптома атеросклероза. Основной причиной ИР при патологии разных органов является описанный нами принцип «биологической субординации». Согласно этому, биологические функции, биологические реакции, гуморальные (гормональные) регуляторы, которые сформированы на более поздних ступенях филогенеза, не могут оказывать влияние на более ранние регуляторные системы. Это даже можно сравнивать с «функциональными запретами» биологии [41]. Гипергликемия и даже гиперинсулинемия в межклеточной среде и плазме крови а) не в силах остановить липолиз в ИНС-зависимых адипоцитах, б) увеличение содержания НЭЖК в плазме крови, в) пассивное поглощение их ИНС-зависимыми миоцитами и г) окисление митохондриями КТ и ЖК, если они активированы гиперсекрецией филогенетически более ранних, чем ИНС, гормонов. Цикл Рендла [42] функционирует только на аутокринном уровне, в клетках и определяет чередование в биологической функции питания (трофологии) биологических реакций экзо- и эндотрофии. Этого цикла нет в паракринных сообществах клеток, тем более он не функционирует на уровне организма. Гиперлипидемия, гипертриглицеридемия и повышение содержания НЭЖК+АЛБ всегда приведут к гипергликемии, но гипергликемия не «заставит» митохондрии прекратить окисление КТ и ЖК. ИНС в полной мере проявляет свое действие только при физиологичной секреции всех филогенетически ранних гормонов. Они и без ИНС миллионы лет регулировали метаболизм ГЛЮ и ЖК. В этих «сложных» условиях действие филогенетически позднего ИНС на ранний метаболизм ГЛЮ опосредовано через механизмы регуляции ЖК; основой этого действия являются филогенетически еще более древние особенности функции митохондрий. Патогенез многих заболеваний станет более понятным, если мы станем рассматривать его в эволюционном аспекте, поэтапно, в становлении на разных ступенях филогенеза в рамках предложенной нами теории биологических функций и биологических реакций [43].

#### Литература

1. Дедов И.И., Балаболкин М.М., Мамаева Г.Г. и др. Инсулиновая резистентность и роль гормонов жировой ткани в развитии сахарного диабета: Пособие для врачей. Минздравсоцразвитие. М., 2005.
2. Roden M. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle // *News Physiol. Sci.* 2004; 19: 92–96.
3. Тутов В.Н. Резистентность к инсулину как блокада рецепторного поглощения клетками насыщенных жирных кислот в форме триглицеридов // *Клин. лаб. диагностика.* 2003; 11: 3–10.



4. *Тумов В.Н.* Филогенез, становление переноса и поглощения клетками жирных кислот, биологической функции локомоции и действие инсулина. Патогенез синдрома резистентности к инсулину // *Клин. лаб. диагностика.* 2010; 6: 3–17.
5. *Бойко Е.Р., Людина А.Ю., Бурых Э.А.* и др. Изменение пула жирных кислот в плазме крови человека при воздействии острой нормобарической гипоксии // *Росс. физиол. журнал.* 2010; 96 (5): 441–454.
6. *Тумов В.Н., Лисицин Д.М.* Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина. М.: Триада, 2006: 514–672.
7. *Shibazaki S., Eguchi R., Matsui Y.* et al. Adrenic blockade improved insulin resistance in patients with morning hypertension; the Japan morning surge-1 study // *J. Hypertension.* 2009; 27: 252–257.
8. *Sámel M., Pullmann R., Dobias J.* et al. Development of brown adipose tissue in the rat and thyroxine administration influence // *Bratisl. Lek. Listy.* 1994; 5 (8): 57–63.
9. *Leahy J.* Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus // *Arch. Med. Res.* 2005; 36 (3): 197–209.
10. *Wasko M.C., Kay J., Hsia E.C.* et al. Diabetes mellitus and insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis: Risk reduction in a chronic inflammatory disease // *Arthritis Care Res.* 2011; 63 (4): 512–521.
11. *Chang X., Jorgensen A.M., Bardrum P., Led J.J.* Solution structures of the R6 human insulin hexamer // *Biochemistry.* 1997; 36 (31): 9409–9422.
12. *Brijusell M., Admyre T., Göransson M.* et al. Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2-deficient mice fed a high-fat diet // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011; 300 (1): 211–220.
13. *Sasak G., Sezer S., Colak T.* et al. Factors associated with insulin resistance after long term renal transplantation // *Transplant. Proc.* 2011; 43 (2): 575–577.
14. *Timmers S., Schrauwen P., de Vogel J.* Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance // *Physiol. Rev.* 2008; 94 (2): 242–251.
15. *Fernandez-Real J.M., Ricart W.* Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome // *Endocrine. Rev.* 2003; 24 (3): 278–301.
16. *Pickersgill L., Litherland G.J., Greenberg A.S.* Key role for ceramides in mediating insulin resistance in human muscle cells // *J. Biol. Chem.* 2007; 282 (17): 12583–12589.
17. *van Oostrom A., Cabezas M.C., Rabelink T.J.* Insulin resistance and vessel endothelial function // *J. Soc. Med.* 2002; 95 (42): 54–61.
18. *Rim-Dorner S.J., Deuster P.A., Zeno S.A.* Should triglycerides and the triglycerides in high-density lipoprotein cholesterol ratio be used as surrogates for insulin resistance? // *Metabolism.* 2010; 59 (2): 299–304.
19. *Samokhvalov V., Bilan P.J., Schertzer J.D.* et al. Palmitate- and lipopolysaccharide-activated macrophages evoke contrasting insulin responses in muscle cells // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2009; 296 (1): 37–46.
20. *Тумов В.Н.* Первичный и вторичный атеросклероз, атероматоз и атеротромбоз. М., 2008: 13–43.
21. *Kim J.K.* Inflammation and insulin resistance: An old story with new ideas // *Korean Diabetes J.* 2010; 34 (3): 137–145.
22. *Алексеева Р.И., Шарафетдинов Х.Х., Плотникова О.А.* и др. Роль полиненасыщенных жирных кислот семейства  $\omega$ -3 в профилактике и лечении сахарного диабета 2-го типа // *Росс. мед. журнал.* 2009; 5: 42–46.
23. *Balasubramanian K., Schroit A.J.* Aminophospholipid asymmetry: a matter of life and death // *Annu. Rev. Physiol.* 2003; 65: 701–734.
24. *Larbi A., Grenier A., Frisch F.* et al. Acute in vivo elevation of intravascular triacylglycerol lipolysis impairs peripheral T cell activation in humans // *Am. J. Clin. Nutr.* 2005; 82 (5): 949–956.
25. *Waczulikova I., Cagalinec M., Ulicna O.* et al. Biophysical investigation on left ventricular myocytes in rats with experimentally induced diabetes // *Physiol. Res.* 2010; 59 (Suppl 1): 9–17.
26. *Cohen A.W., Combs T.P., Scherer P.E., Lisanti M.P.* Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003; 285 (6): 1151–1160.
27. *Saltiel A.R., Pessin J.E.* Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane // *Traffic.* 2003; 4 (11): 711–716.
28. *Kantar A., Littarru G.P., Falcioni G.* et al. Plasma membrane fluidity and polarity of polymorphonuclear leukocytes from children with type I diabetes mellitus // *J. Diabetes. Complications.* 1999; 13 (5–6): 243–250.
29. *Caimi G., Sinagra D., Canino B.* et al. Polymorphonuclear leukocyte membrane fluidity before and after activation in subjects with insulin resistance // *Acta Diabetol.* 2000; 37 (1): 9–12.
30. *Eyster C.A., Olson A.L.* Compartmentalization and regulation of insulin signaling to GLUT4 by the cytoskeleton // *Vitam. Hor.* 2009; 80: 193–215.
31. *Elmendorf J.S.* Fluidity of insulin action // *Mol. Biotechnol.* 2004; 27 (2): 127–138.
32. *Manten G., van der Hoek Y.Y., Sikkema J.M.* et al. The role of lipoprotein (a) in pregnancies complicated by pre-eclampsia // *Med. Hypotheses.* 2005; 64 (1): 162–169.
33. *Зефиоров А.Л., Петров А.М.* Липиды в процессе эндо- и экзоцитоза синаптических везикул // *Росс. физиол. журнал.* 2010; 96 (8): 753–765.
34. *Панков Ю.А.* Генетические варианты регуляции энергетического баланса // *Биомед. химия.* 2010; 56 (2): 152–167.
35. *Li L., Naples M., Song H.* et al. LCAT-null mice develop improved hepatic insulin sensitivity though altered regulation of transcription factors and suppressors of cytokine signaling // *Am. Physiology Endocrinol. Metab.* 2007; 293 (2): 587–594.
36. *Тумов В.Н.* Теория биологических функций и ее применение при выяснении патогенеза распространенных заболеваний человека // *Успехи соврем. биологии.* 2008; 128 (5): 435–452.
37. *Абрамов В.В., Абрамова Т.Я.* Интерлейкин-1 в цитокиновой сети: фундаментальные и прикладные аспекты // *Успехи соврем. биологии.* 2007; 127 (6): 570–579.
38. *Adhikari N., Basi D.L., Celson M.* et al. Increase in GLUT1 in smooth muscle alters vascular reactivity and increased inflammation in response vascular injury // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31 (1): 86–94.
39. *Utzschneider R., Rahn S.* The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease // *J. Clin. Endocr. Metabol.* 2006; 91 (12): 4735–4761.
40. *Chavez-Tapia N.C., Barrientos-Gutierrez T., Tellez-Avila F.I.* et al. Insulin sensitizers in treatment of nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review // *World J. Gastroenterol.* 2006; 12 (48): 7826–7831.
41. *Свердлов Е.Д.* Фундаментальные запреты биологии // *Биохимия.* 2009; 74 (9): 157–1164.
42. *Randle P.J., Garland P.B., Hales C.N.* et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus // *Lancet.* 1963; 1: 7285: 785–789.
43. *Тумов В.Н.* Биологические функции (экзотрофия, гомеостаз, эндоэкология), биологические реакции (экскреция, воспаление, транцитоз) и патогенез артериальной гипертензии. Тверь: Триада, 2009: 7–80.

## ПРОБЛЕМА САХАРНОГО ДИАБЕТА С ПОЗИЦИИ ОНТОГЕНЕЗА

В.И. ОДИН

ФГБВОУ ВПО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург

**Резюме.** *Нерешенные вопросы сахарного диабета сегодня, на наш взгляд, во многом обусловлены узкодисциплинарным подходом лечения «идеального пациента» без учета пола, возраста, этнического и фамильного происхождения.*

*В данной статье рассматриваются онтогенетические особенности сахарного диабета старшей возрастной группы, который является одной из составляющих комплекса главных неинфекционных болезней, присущих человеку в пожилом возрасте и закономерно возникающих в результате дрейфа гомеостаза. Поэтому с точки зрения онтогенеза существенным представляется отсутствие онтогенетического подразделения диабета. Нами было проведено оригинальное подразделение обследованных 169 больных женщин на 5 групп, различных по форме диабета в зависимости от онтогенетической фазы дебюта болезни: 1. Менструальная форма СД2 (дебют в репродуктивную фазу онтогенеза); 2. Ранне-постменопаузальная форма СД2; 3. Поздне-постменопаузальная форма СД2; 4. Ранне-инволютивная форма СД2; 5. Поздне-инволютивная форма СД2.*

*В целом в обследованной когорте величина коморбидного индекса была позитивно ассоциирована с возрастом, величиной массы тела и числом случаев семейного диабета и, напротив, негативно с величиной гликемии. Минимальный коморбидный индекс определялся в поздне-инволютивной группе, особенно за счет наиболее низкой частоты случаев заболеваний желудочно-кишечного тракта и опорно-двигательного аппарата. В этой же группе определялась негативная связь возраста и величины коморбидного индекса. Коморбидный индекс позитивно коррелировал с величиной аффективного индекса, с приоритетной связью в ранне-инволютивной группе. В ранне-фазовых, ранне-постменопаузальной и ранне-инволютивной группах отмечалось недостоверное доминирование величины коморбидного индекса в сравнении с поздно-фазовыми (поздне-постменопаузальная и поздне-инволютивная) группами. Данная тенденция наблюдалась на фоне реципрокных взаимоотношений в данных группах частоты случаев фамильного диабета и случаев семейного долгожительства. Полученные данные, в частности, подтверждают тезис о необходимости более широкого использования термина «первичное здоровье» и его составляющих, в том числе учета наличия фамильных заболеваний и случаев семейного долгожительства.*

*С тех же онтогенетических позиций ранее нами был апробирован геронтологический подход к лечению СД2 путем применения у таких больных геропротекторов. Назначение этих препаратов привело к целому спектру позитивных изменений как диабетологически, так и гериатрически значимых параметров.*

*Резюмируя имеющиеся данные о природе сахарного диабета 2-го типа, следует подчеркнуть, что кроме общепринятых на сегодня метаболических критериев компенсации диабета, необходимых для превенции развития макро- и микрососудистых осложнений диабета, следует шире использовать онтогенетические маркеры, параметры, характеризующие первичное здоровье, и диагностические критерии постановки диагноза сопутствующих заболеваний, поскольку только такой интегральный подход к оценке происходящих изменений в организме конкретного пациента может дать правильный ответ и решить проблему благоприятного прогноза как для жизни, так и для качества этой конкретной жизни.*

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2-го типа, онтогенез, пожилые, старение.

## PROBLEM OF DIABETES MELLITUS FROM POINT OF VIEW OF ONTOGENESIS

V.I. ODIN

Federal State Budget Institution of Higher Professional Education S.M. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defence of Russian Federation, Saint-Petersburg

**Summary.** *The existing problems of diabetes mellitus seem to be caused by narrow discipline-related approach to treatment of “ideal patient” without taking into attention the gender, age, ethnic and hereditary factors.*

*The article discusses the ontogenetic peculiarities of diabetes mellitus in elder age group. This disease is one of the main non-infectious conditions, existing in elder age individuals due to the changes of homeostasis. That’s why from point of view of ontogenesis the absence of ontogenetic classification of diabetes seems to be important. Our investigations included 169 females who might be classified to 5 groups basing on the age of the disease onset: 1. Menstrual variant (onset in reproductive*

period of ontogenesis); 2. Early-postmenopausal variant; 3. Late-postmenopausal variant; 4. Early-involutive variant; 5. Late-involutive variant of diabetes mellitus.

In general the level of comorbidities index positively correlated with age, body mass and number of the disease cases in family. Negative correlation was found with the level of glycemia. Minimal comorbidity index was found in late involutive group, especially due to the low number of gastrointestinal and bones and muscles diseases cases. In the same group the negative link was found between the age and comorbidity index. Comorbidity index positively correlated with the affective index, priority links in early involutive groups. In early phases, early-postmenopausal and early involutive groups the insignificant domination of comorbidities index was revealed if compared to late phases (late-postmenopausal and late involutive) groups. The reciprocal links exist between the number of diabetes cases in family and long life in family cases.

The obtained results confirm the idea about necessity of the more wide use of the term "primary health" and its components, also taking into attention the incidence of the diseases and long life in families. We also used the gerontological approach of second type diabetes treatment. This approach was based on the same ontogenetic position and included the use of geroprotectors. The use of these drugs lead to the wide spectrum of positive changes both from point of view of diabetes course and parameters important in geriatrics.

Finally it is necessary to underline that, apart from widely used metabolic criteria of diabetes mellitus compensation (which are necessary for prevention of micro- and macrovascular complications) we should use ontogenetic markers, parameters characterizing the primary health and diagnostic criteria of the concomitant diseases. This integrative approach to evaluation of the changes in concrete individual patient can help us in concrete situation and optimize the prognosis both for life duration and life quality.

**Key words:** diabetes mellitus type 2, ontogenesis, aged, aging.

#### Данные для корреспонденции:

Один Виталий Иванович

194175, Санкт-Петербург, ул. Боткинская, 20,

Военно-медицинская академия, кафедра факультетской терапии имени проф. С.П. Боткина,

OdinVitali@mail.ru

Несмотря на гигантские успехи в изучении вопросов этиологии и патогенеза сахарного диабета и внедрения этих знаний в практическую медицину, сахарный диабет в XXI веке по-прежнему занимает лидирующие позиции по смертности и инвалидизации среди прочих хронических болезней.

Нерешенные вопросы сахарного диабета сегодня, на наш взгляд, во многом обусловлены узкодисциплинарным подходом, при котором в центре внимания находятся практически исключительно гипергликемия и ее последствия в «идеальном» организме. Такая постановка вопроса обусловлена, несомненно, методической сложностью задачи изучения диабета во всех его ипостасях и тонкостях, запросами практического здравоохранения на простой и удобный алгоритм курации, установками страховых медицинских компаний на рентабельный паттерн «обслуживания» таких больных, а также низкой заинтересованностью диабетологов в разработке вопросов особенностей болезни у лиц различного пола, возраста, семейного и этнического происхождения.

В данной статье хотелось бы остановиться на онтогенетических особенностях сахарного диабета старшей возрастной группы. Важность такого ракурса, с одной стороны, обусловлена стремительным увеличением как абсолютного числа людей старшей возрастной группы, так и её относительной пропорции в общей структуре населения, что именуется феноменом «старения населения», при этом темпы старения в России в 2 раза опере-

жают общемировые [1]. С другой стороны, именно эта часть населения определяет заболеваемость сахарным диабетом 2-го типа (СД2); так, частота СД2 у пожилых европейцев достигает 20%, а средний возраст популяции больных СД2 в различных исследованиях неизменно превышает 60 лет, и при этом необходимо подчеркнуть, что СД2 обуславливает более 90% всех случаев диабета в популяции [2, 3, 4].

С точки зрения онтогенеза необходимо отметить, что возникновение нарушенной толерантности к глюкозе (НТГ) в старших возрастных группах отражает процесс старения, а наблюдаемое значительное число случаев СД2 у пожилых отражает связь этого заболевания с возрастом, хотя по мере увеличения возраста нарастание числа больных диабетом отмечается параллельно с увеличением частоты НТГ [2, 5]. В эндокринологическом ракурсе в позднем онтогенезе отмечается выраженное снижение содержания в крови некоторых гормонов, которое предлагается трактовать как определенные клинические синдромы: эстрогенов (менопауза), тестостерона (андропауза), ДГА (дегидроэпиандростерон) и его сульфата (адренопауза), соматотропного гормона (СТГ) и инсулинподобного фактора роста-1 (ИФР-1) (соматопауза) [6].

Данные гормональные феномены связываются с возраст-ассоциированными патологическими находками, в связи с чем предлагается проведение мер превентивного характера, прежде всего, заместительной гормо-

нальной терапии (соответственно, эстрогенами и т. д.). В свою очередь болезнь-ассоциированные патологические процессы, такие как СД2, преимущественно наблюдаются у пожилых и тесно связаны с процессами старения. Так, сахарный диабет 2-го типа является одной из составляющих комплекса главных неинфекционных болезней, которым подвергается человек в пожилом возрасте. Согласно онтогенетической модели развития возрастной патологии — атеросклероза, СД2, ожирения и рака, имеются единые механизмы развития данных болезней, закономерно возникающие в результате дрейфа гомеостаза [7]. Так, в энергетическом гомеостате это проявляется реверсией доминирования от ингибирующего действия глюкозы к тормозящему эффекту жирных кислот, что отражается в возрастном снижении базальной секреции соматотропина [8] и развитии феномена соматопаузы. С увеличением возраста отмечаются нарастание базальной и реактивной гиперинсулинемии и гипергликемии, со сдвигом гликемической и инсулинемической кривой в глюкозо-толерантном тесте вправо, и уменьшение угла наклона кривой содержания жирных кислот. У молодых людей отмечается подъем уровня гликемии после еды на 1–3 ммоль/л и возврат к исходному уровню через 2 часа. С возрастом отмечается нарастание постпрандиального уровня гликемии на 5–10 мг% каждые 10 лет после 5-й декады [9]. Значения глюкозы крови натощак изменяются менее значительно и составляют от 1 до 2 мг% в декаду [10]. В целом возраст имеет независимое влияние на толерантность к глюкозе [11].

В рамках элевационной модели старения В.М. Дильман описал три, по его мнению, важнейших гомеостата — энергетический гомеостат, адаптационный и репродуктивный. В работах его научного коллектива было показано, что изменения в этих трех гомеостатах, вследствие возрастного повышения чувствительности центральных регуляторных органов к сигналам обратной связи, являются принципиальными с точки зрения старения, приводя к возникновению главных неинфекционных болезней человека и, соответственно, к его смерти [7].

С точки зрения онтогенеза существенным представляется отсутствие на сегодня онтогенетического подразделения диабета. По современной классификации диабета, в основу которой положен этиопатогенетический принцип, не различаются возрастные типы диабета, поскольку показано, что как аутоиммунный СД, прежде называемый «ювенильным диабетом», может быть в пожилом возрасте, так и СД2, прежде называемый «диабетом пожилых», наблюдается у подростков, как MODY тип [12, 13]. Тем не менее, в практической диабетологии широко используются понятия «подростковый диабет», т. е. диабет, манифестирующий в период пубертата, «детский диабет», под которым обычно понимают диабет, дебютировавший в дошкольном возрасте, и эта акцентуация имеет прикладное значение, т. к.

дает врачу возможность прогноза течения и управляемости болезни.

Действительно, «детский диабет» склонен к индукции задержки роста и полового развития, а «подростковый диабет» имеет склонность к инсулинрезистентности, лабильности и кетоацидозу. Данные особенности напрямую связаны с особенностями, связанными с периодами дебюта болезни, в первом случае это еще окончательно не развившаяся эндокринная система, прежде всего, тиреостат и ось СТГ/ИФР-1, с ведущей «флуктуирующей» ролью надпочечников, а во втором случае прогрессирование пубертата и переустановка гонадостата с инфантильного на репродуктивный паттерн. Соответственно, эти отличия от «обычного ювенильного диабета», возникающего у взрослых лиц, предполагают иное клиническое течение данных форм.

С онтогенетической точки зрения существенным является наличие строгой эпидемиологической закономерности увеличения заболеваемости СД1 в препубертатном периоде 5–9 лет в сравнении с ранним возрастом 0–5 лет в 2 раза и дальнейшее двукратное увеличение заболеваемости в пубертатном периоде 10–14 лет в сравнении с предшествующим препубертатным [14]. С клинической точки зрения важным является наличие показанных различными авторами значительных особенностей, характеризующих тяжесть течения диабета, прежде всего пубертатной формы в сравнении с препубертатной. Наиболее характерным отличием пубертатной формы диабета от препубертатной являются более частое поражение сетчатки и почек. Более того, больные диабетом с дебютом в 12 лет имеют двукратно превосходящую смертность в сравнении со сверстниками, страдающими препубертатной формой диабета (дебют — 6, 7 лет), в основном связанную с диабетической нефропатией (ДНФ) [15]. При гендерном анализе также имеется существенная разница в длительности «медового месяца диабета», так, у мальчиков в пре- и пубертате этот период был значительно длиннее, чем у девочек [16].

В данном контексте следует напомнить специфический для детской диабетологии синдром Мориака, протекающий как диабетическая карликовость с кушингоидными проявлениями [17]. Причем при попытке достичь компенсации у таких больных наблюдается резкое прогрессирование микроангиопатических осложнений [18].

Что касается других возрастных групп, то имеются одиночные сообщения, анализирующие клинико-патфизиологические особенности диабета старших возрастных групп. Ранее предпринималась попытка создания возрастной классификации для сравнения статистических данных в рамках международной научной диабетологической общности: диабет детей (0–14 лет), юношеский диабет (15–24 года), диабет взрослых (25–64 года) и старческий диабет (старше 65 лет) [19]. Но эта классификация не получила на том этапе медицин-



ской науки значимого применения и дальнейшего развития.

Таким образом, учитывая вышесказанное, нами было проведено оригинальное подразделение обследованных 169 больных женщин на 5 групп, различных по форме СД2 в зависимости от онтогенетической фазы дебюта болезни: 1. Менструальная форма СД2 (дебют в репродуктивную фазу онтогенеза); 2. Ранне-постменопаузальная форма СД2 (дебют в ранне-постменопаузальную фазу); 3. Поздне-постменопаузальная форма СД2 (дебют в поздне-постменопаузальную фазу); 4. Ранне-инволютивная форма СД2 (дебют в ранне-инволютивную фазу онтогенеза); 5. Поздне-инволютивная форма СД2 (дебют в поздне-инволютивную фазу онтогенеза) [2].

В целом в обследованной когорте величина коморбидного индекса была позитивно ассоциирована с возрастом, величиной массы тела и числом случаев семейного диабета и, напротив, негативно с величиной гликемии. Минимальный коморбидный индекс определялся в поздне-инволютивной группе, особенно за счет наиболее низкой частоты случаев заболеваний желудочно-кишечного тракта и опорно-двигательного аппарата. В этой же группе определялась негативная связь возраста и величины коморбидного индекса. Коморбидный индекс позитивно коррелировал с величиной аффективного индекса, с приоритетной связью в ранне-инволютивной группе. В ранне-фазовых, ранне-постменопаузальной и ранне-инволютивной группах отмечалось недостоверное доминирование величины коморбидного индекса в сравнении с поздно-фазовыми (поздне-постменопаузальная и поздне-инволютивная) группами. Данная тенденция наблюдалась на фоне реципрокных взаимоотношений в данных группах частоты случаев семейного диабета и случаев семейного долгожительства [20]. Полученные данные, в частности, подтверждают тезис о необходимости более широкого использования термина «первичное здоровье» и его составляющих, в том числе учета частоты случаев семейного диабета и случаев семейного долгожительства [21].

Таким образом, нами были обнаружены существенные патофизиологические различия у больных диабетом женщин с дебютом болезни в различные онтогенетические периоды второй половины жизни.

Ранее нами был апробирован геронтологический подход к лечению СД2 путем применения у таких больных средств, имеющих репутацию «геропротекторов». Назначение этих препаратов привело к целому спектру позитивных изменений как диабетологически, так и гериатрически значимых параметров [22, 23].

Резюмируя имеющиеся данные о природе сахарного диабета 2-го типа, следует подчеркнуть, что кроме общепринятых на сегодня метаболических критериев компенсации диабета, необходимых для превенции развития макро- и микрососудистых осложнений диабета, следует шире использовать онтогенетические маркеры, параметры, характеризующие первичное здоровье, и диагно-

стические критерии постановки диагноза сопутствующих заболеваний, поскольку только такой интегральный подход к оценке происходящих изменений в организме конкретного пациента может дать правильный ответ и решить проблему благоприятного прогноза, как для жизни, так и для качества этой конкретной жизни.

#### Литература

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: в 2 т., 2-е изд., перераб. и доп. СПб.: Наука, 2008.
2. DECODE Study Group. Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts / DECODE Study Group // *Diab. Care*. 2003; 26 (1): 61–69.
3. Danaei G., Finucane M.M., Lu Y., Singh G.M., Cowan M.J., Paciorek C.J., Lin J.K., Farzadfar F., Khang Y.H., Stevens G.A., Rao M., Ali M.K., Riley L.M., Robinson C.A., Ezzati M. Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2,7 million participants // *Lancet*. 2011 Jul 2; 378 (9785): 31–40.
4. Winer N., Sowers J.R. Epidemiology of diabetes // *J. Clin. Pharmacol.* 2004; 44 (4): 397–405.
5. Cowie C.C., Rust K.F., Byrd-Holt D.D., Eberhardt M.S., Flegal K.M., Engelgau M.M., Saydah S.H., Williams D.E., Geiss L.S., Gregg E.W. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults in the U.S. population: National Health And Nutrition Examination Survey 1999–2002 // *Diabetes Care*. 2006 Jun; 29 (6): 1263–1268.
6. Lamberts S.W.J., van den Beld A., van der Lely A.J. The endocrinology of aging // *Science*. 1997; 278: 419–424.
7. Дильман В.М. Четыре модели медицины. Л.: Медицина, 1987.
8. Бобров Ю.Ф., Гамаюнова В.Б., Вишневский А.С., Остроумова М.Н., Дильман В.М. Регуляция энергетического гомеостата у больных раком тела матки и молочной железы. Нейроэндокринная система, метаболизм, иммунитет и рак (клинические аспекты). СПб., 1992: 24–39.
9. Andres R. Aging and diabetes // *Med. Clin. North Am.* 1971; 55: 835–837.
10. Davidson M.B. The effect of aging on carbohydrate metabolism. A review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly // *Metabolism*. 1979; 28: 688–693.
11. Shimokata H., Muller D.C., Fleg J.L. et al. Age as independent determinant of glucose tolerance // *Diabetes*. 1991; 40: 44–51.
12. Один В.И. Аутоиммунный сахарный диабет. СПб.: ВМедА, 2003: 344.
13. World Health Organization (WHO). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation. Geneva: WHO Departemenr of Noncommunicable Disease Surveillance, 1999: 65.
14. Podar T., Solntsev A., Karvonen M., Padaiga Z., Brigis G., Urbonaite B., Viik-Kajander M., Reunanen A., Tuomilehto J. Increasing incidence of childhood-onset type I diabetes in 3 Baltic countries and Finland 1983–1998 // *Diabetologia*. 2001; 44 (Suppl 3): 17–20.
15. Nishimura R., Tajima N., Matsushima M., LaPorte R.E. Puberty, IDDM, and death in Japan. Diabetes Epidemiology Research International Study Group // *Diabetes Care*. 1998 Oct; 21 (10): 1674–1679.
16. Gordonouri O., Danne T., Enders I., Weber B. Does the long-term clinical course of type I diabetes mellitus differ in patients with

prepubertal and pubertal onset? Results of the Berlin Retinopathy Study // Eur. J. Pediatr. 1998 Mar; 157 (3): 202–207.

17. Kim M.S., Quintos J.B. Mauriac syndrome: growth failure and type 1 diabetes mellitus // Pediatr. Endocrinol. Rev. 2008 Aug; 5 (Suppl. 4): 989–993.

18. Daneman D., Drash A.L., Lobes L.A., Becker D.J., Baker L.M., Travis L.B. Progressive retinopathy with improved control in diabetic dwarfism (Mauriac's syndrome) // Diabetes Care. 1981 May-Jun; 4 (3): 360–365.

19. ВОЗ. Сахарный диабет. Доклад экспертов ВОЗ № 310. Женева, 1966: 96.

20. Один В.И., Беликова Т.В., Шустов С.Б., Пушкова Э.С., Эмануэль В.Л. Сахарный диабет у пожилых: коморбидные характерис-

тики пациентов с различными онтогенетическими формами болезни // Успехи геронтологии. 2006; 18: 90–95.

21. Один В.И. Кризис геронтологии: к вопросу о первичном здоровье в XX веке // Успехи геронтологии. 2011; 24 (1): 11–23.

22. Один В.И., Беликова Т.В., Пушкова Э.С. Сахарный диабет у пожилых: соединения янтарной кислоты в лечении диабетической нейропатии // Успехи геронтологии. 2002; 9: 83–87.

23. Один В.И., Беликова Т.В., Пушкова Э.С., Барр Н.А. Сахарный диабет у пожилых: гепротективные и противодиабетические свойства препарата дельта-сон индуцирующего пептида // Успехи геронтологии. 2004; 15: 101–114.

Начало на стр. 20

их качества и метрологической корректности; современное представление о системе гемостаза и методы оценки состояния системы, оценка функциональной активности тромбоцитов, наследственные тромбоцитопатии и коагулопатии, тромбофилии (особенности генетических нарушений и клинико-лабораторных проявлений), синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, лабораторный контроль антикоагулянтной и дезагрегантной терапии, инструментальные методы проведения исследований тромбоцитарного и плазменного звеньев гемостаза.

### 5. Молекулярно-биологические методы исследования в практике клинико-диагностической лаборатории

**Категория слушателей:** заведующие, врачи и биологи клинико-диагностических лабораторий.

**Основные вопросы:** основы организации лабораторной службы с учетом применяемых технологий, обеспечение качества исследований, разбор основных вопросов общей и клинической генетики, тканевого типирования, основы ПЦР и современных молекулярно-генетических методов исследования; методы оценки экспрессии генов (RealTime PCR), лабораторный скрининг наследственных болезней; вопросы молекулярно-биологических исследований в гематологии, кардиологии, урологии, акушерстве и гинекологии и др. Практические занятия знакомят слушателей с особенностями работы молекулярно-генетической лаборатории, нюансами забора и подготовки клинического материала для исследования, работы с готовыми наборами реактивов, а также с основами приготовления ПЦР смесей. На основании полученных знаний слушатели приобретают навыки клинической интерпретации полученных результатов, проводятся разборы типичных клинических случаев.

Выбор способов выявления инфекционных заболеваний: классические бактериологические методы, выявление специфических антител, обнаружение специфических микробных или вирусных антигенов, молекулярно-диагностические методы (чаще всего — ПЦР-диагностика) и интерпретация результатов. ДНК-диагностика вирусных инфекций на разных стадиях инфекции, иммунологические методы диагностики в различных клинических дисциплинах. Общеклиническая проблема — молекулярная диагностика гепатитов и ВИЧ-инфекции. Для гинекологов будут интересны принципы диагностики скрытых инфекций мо-

чеполовой сферы, сведения об ее эффективности и ограничениях. Рассматривается проблема папилломавирусной инфекции и ее диагностики в аспекте онкологического риска. Для врачей-дерматологов предназначены лекции о молекулярной диагностике грибковых инфекций кожи (трихофитии, микроспории и др.). Общий интерес вызывает генодиагностика зоонозов — актуальный раздел медицинских исследований. Выявление генов предрасположенности к различным хроническим заболеваниям (сердечно-сосудистым, легочным, онкологическим, а также к отдельным видам иммунопатологии), актуальность и целесообразность диагностики тех или иных «генов предрасположенности» и перспективы создания «генетического паспорта».

### 6. Лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний

**Категория слушателей:** врачи различных клинических специальностей, заведующие, врачи и биологи клинико-диагностических лабораторий.

**Основные вопросы:** организация деятельности лабораторной службы с учетом используемых технологий, обеспечение качества лабораторных исследований; основы клинической иммунологии, патогенетические аспекты аутоиммунных заболеваний, диагностическое значение различных аутоантител, методы диагностики и мониторинга, методы оценки общей и местной аутореактивности организма, диагностические профили при различных аутоиммунных заболеваниях, связь аутоиммунных заболеваний и нефропатий.

### Цикл тематического усовершенствования для среднего медперсонала

#### Лабораторная диагностика в учреждениях здравоохранения (для среднего медперсонала)

**Категория слушателей:** медицинские технологи, лабораторные техники (фельдшера-лаборанты), лаборанты, медицинские сестры, старшие медицинские сестры.

**Основные вопросы:** основы организации лабораторной службы, взаимодействие клинического персонала и сотрудников лабораторий в обеспечении качества лабораторной диагностики, санитарно-эпидемиологический режим, гематологические, биохимические, гемостазиологические, химико-микроскопические, иммунологические исследования; лабораторные исследования, выполняемые клиническим персоналом.

## АВТОМАТИЗИРОВАННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕМОГЛОБИНА, ВЫБОР МЕТОДА

**А.В. БАГАЕВ**

**ЗАО «АНАЛИТИКА», г. Москва**

**Резюме.** В статье описываются достоинства и недостатки сертифицированных методов определения HbA1c. Оценивается степень влияния интерферирующих факторов на результаты исследований, приводятся аналитические характеристики современного ВЭЖХ анализатора гликогемоглобина.

**Ключевые слова:** гликогемоглобин HbA1c, методы определения, сертификат NGSP, интерференция, минорные фракции гемоглобинов.

## AUTOMATE-BASED EVALUATION OF GLYCOHEMOGLOBIN. HOW TO CHOOSE A METHOD

**A.V. BAGAEV,**

**PhD, Chief specialist for production**

**«Analytica», Moscow**

**Summary.** The article describes the positive and negative features of certified methods for HbA1c evaluation. The degree of influence of interfering factors on the obtained results is discussed, the analytic characteristics of modern High effective liquid chromatography analyzer are given. This device can be used for glycated hemoglobin evaluation.

**Key words:** glycated hemoglobin HbA1c, methods of evaluation, certificate NGSP, interference, minor hemoglobin fractions.

### **Данные для корреспонденции:**

*Андрей Владимирович Багаев*

к. м. н., ведущий специалист по продукции ЗАО «АНАЛИТИКА», г. Москва,  
тел. (495) 737-03-63, 748-11-69 внутр. 139, багаев@analytica.ru

Широкая распространенность заболевания диабетом, поздняя диагностика и тяжесть осложнений, вызванных неадекватной терапией, определяют актуальность внедрения в лабораторную практику надежных и доступных методов измерения гликированного гемоглобина в крови. При выборе метода исследования и конкретного анализатора в первую очередь следует обратить внимание на наличие сертификата NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program, США). В России наличие этого документа не является обязательным, тем не менее, данный критерий позволяет значительно сузить круг оборудования, отвечающего современным требованиям и проверенного независимыми авторитетными лабораториями.

Методы определения гликогемоглобина, реализованные в современных автоанализаторах, можно разделить на пять групп: ионообменная хроматография высокого (ВЭЖХ) и низкого давления, аффинная хроматография, иммунохимия, капиллярный электрофорез и прямое энзиматическое определение.

При выборе конкретного производителя анализатора или набора реагентов из перечня, имеющего сертификат, NGSP рекомендует отдавать предпочтение тем

образцам, при использовании которых минимизирован эффект интерференции. Искажение результатов могут давать наличие патологических фракций гемоглобина (HbS, HbC и др.), повышенное содержание HbF, карбамиллированный (у пациентов с уремией) или ацетилированный гемоглобин, повышение уровня лабильных гликированных фракций, гипербилирубинемия, гиперлипидемия, высокие дозы витамина С или витамина Е. Актуальные обобщенные данные размещены на сайте NGSP [1].

Степень интерференции при исследовании гликогемоглобина зависит не только от используемого метода измерения. Для иммунотурбидиметрических методов эффект интерференции связан с типом используемых антител, для ионообменной хроматографии качество разделения фракций гемоглобинов зависит от типа сорбента, характеристик колонки, состава элюирующих буферов. Поэтому автоанализаторы, в которых используется один и тот же метод определения, могут иметь существенно различающиеся характеристики [2].

Если провести анализ структуры методов определения гликогемоглобина, имеющих действующий сертификат NGSP (рис. 1), то можно констатировать, что

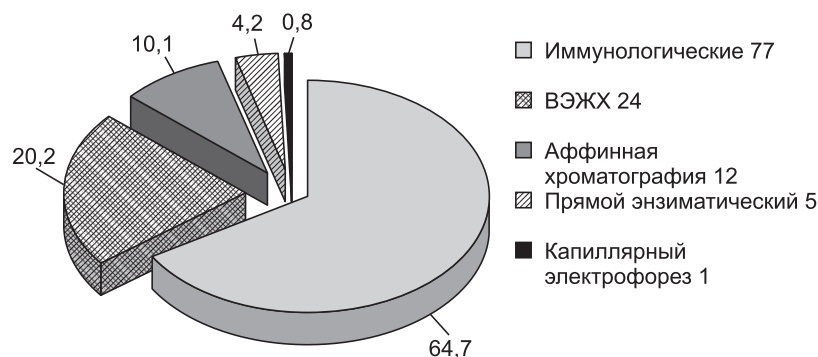


Рис. 1. Структура методов определения гликогемоглобина, имеющих действующий сертификат NGSP (март 2012 г.)

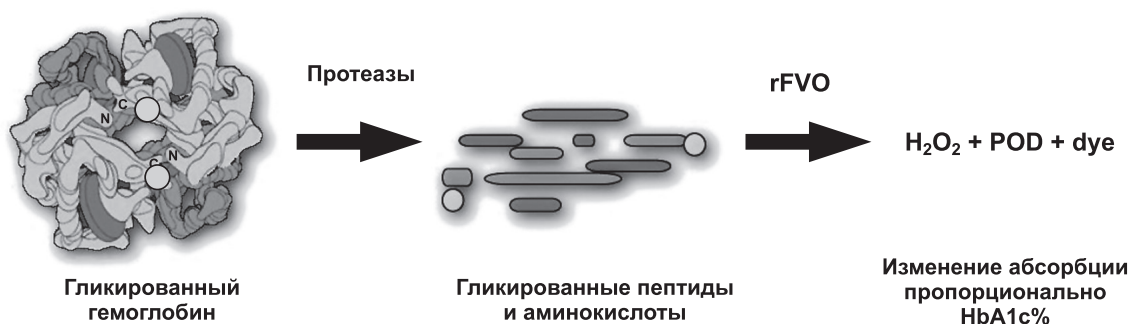


Рис. 2. Схема определения гликогемоглобина прямым энзиматическим методом

более двух третей сертификатов выдано компаниям-изготовителям иммунотурбидиметрических тестов [3]. Популярность этого метода объясняется тем, что он позволяет напрямую, без предварительного определения негликированной фракции определять процентное содержание HbA1c в цельной крови.

Метод основан на конкурентном связывании общего гемоглобина и HbA1c со специфическими латексными частицами пропорционально их концентрации. Моноклональные антитела к HbA1c человека, перекрестно меченные антителами к IgG мыши, специфически взаимодействуют с HbA1c с развитием агглютинации латексных частиц. Степень агглютинации зависит от количества связанного HbA1c. Увеличение мутности смеси измеряется фотометрически. Процентное содержание HbA1c в пробах вычисляется по калибровочной зависимости, установленной при измерении калибраторов. Наряду с хорошими аналитическими характеристиками преимуществом турбидиметрического метода является возможность выполнения измерений на автоматических и полуавтоматических биохимических анализаторах, которые, как правило, уже имеются в лаборатории.

Сравнительно недавно был внедрен в практику метод прямого энзиматического определения гликированной фракции HbA1c [4], который имеет ряд неоспоримых преимуществ. В этом методе гемолизат пробы

цельной крови подвергается воздействию бактериальной протеазы. В результате протеолиза высвобождаются аминокислоты, в том числе гликированный валин бета цепей гемоглобина, который является субстратом для рекомбинантной фруктозилвалинооксидазы (FVO). Этот фермент избирательно расщепляет N-концевой валин с образованием перекиси водорода, концентрация которой измеряется с помощью пероксидазной реакции (рис. 2). Метод имеет сертификат NSGP (Direct Enzymatic HbA1c Assay, Diazyme Laboratories), минорные фракции гемоглобина, в том числе HbC, HbS, HbE, карбамелированный и ацетилованный гемоглобины, а также лабильные фракции не влияют на результат анализа. Концентрация HbA1c рассчитывается с использованием линейной калибровки. В отличие от иммунотурбидиметрических тестов, в составе реагентов отсутствуют латексные частицы, что практически исключает загрязнение кювет и понижает требования к характеристикам биохимического автоанализатора.

В компактных портативных (ПОСТ) анализаторах, как правило, используется метод аффинной хроматографии (борат-ионы), реже иммунохимические методы. Достоинством метода аффинной хроматографии является отсутствие интерференции с промежуточными продуктами гликирования, а также получение корректных результатов при наличии минорных фракций гемоглобинов. Стоимость ПОСТ-анализаторов относительно



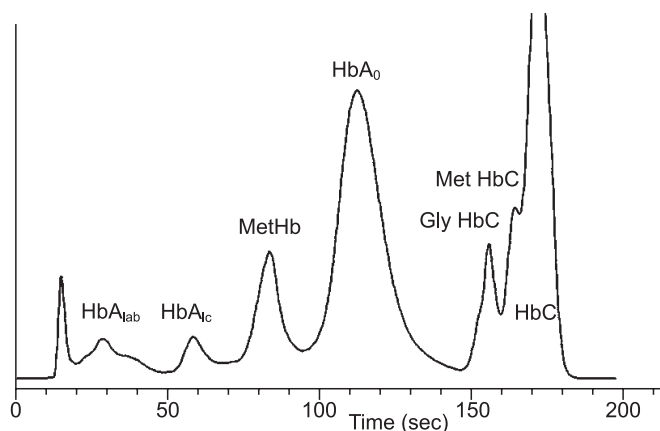


Рис. 3. Хроматограмма пробы с высоким содержанием гемоглобина HbA1c (распечатка анализатора «DS 360»)

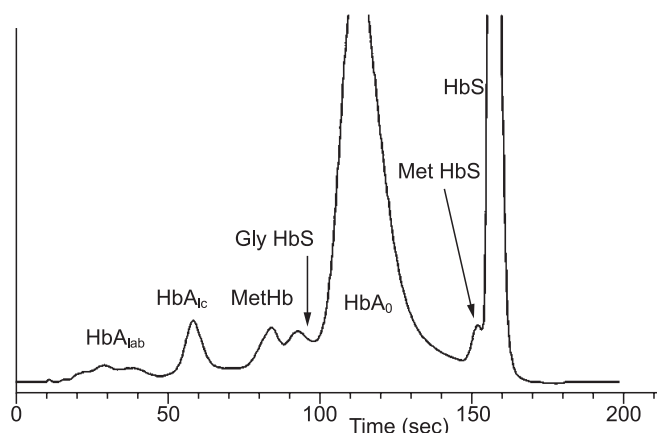


Рис. 4. Хроматограмма пробы с наличием гемоглобина HbAS (распечатка анализатора «DS 360»)

невысокая, однако лишь в отдельных моделях производителям удалось достичь приемлемых показателей точности и воспроизводимости результатов [5], как правило, за счет увеличения стоимости измерительных кассет (картриджей). В современных рекомендациях ADA (American Diabetes Association, США) указывается, что РОСТ-анализаторы нельзя использовать для диагностики сахарного диабета [6].

Специализированные ВЭЖХ-анализаторы позволяют наряду с измерением гликированной фракции определять минорные и патологические фракции гемоглобина. Учитывая современные тенденции развития демографической ситуации в России, нельзя оставлять без внимания факт повышения в общей популяции носителей минорных и патологических форм гемоглобина, для которых в ряде случаев может иметь место неверная интерпретация результатов измерения гликированной фракции. Наряду с высокой точностью измерений, преимуществом ВЭЖХ-анализаторов является наглядность получаемых результатов. Иногда только при анализе хроматограмм, наряду с измерением гликогемоглобина, удастся впервые установить, что пациент является гетерозиготным носителем той или иной формы патологических гемоглобинов (рис. 3, 4). В этом случае, в зависимости от выраженности интерференции, сомнительный результат анализа необходимо верифицировать в «ручном режиме». При измерении проб таких пациентов с использованием других методов нельзя оценить вероятность некорректного результата. Поэтому было бы целесообразно при постановке диагноза «сахарный диабет» или в начале лечения один раз выполнить измерение HbA1c использованием ВЭЖХ-анализатора.

Принимая во внимание ряд очевидных преимуществ анализаторов ВЭЖХ, многие производители лабораторного оборудования освоили их массовое производство, а серийно выпускаемые модели постоянно совершенствуются в соответствии с растущими требованиями лабораторий. Компания «Drew Scientific» (Великобритания), являясь одним из известных производителей

оборудования для гематологических исследований, выпустила новый автоанализатор гликогемоглобина «DS 360», в котором процесс измерения максимально оптимизирован, а стоимость расходных материалов значительно снижена. Автосэмплер, рассчитанный на 36 пробирок, интегрирован в анализатор, прибор позволяет работать как с венозной, так и с капиллярной кровью, взятие аликвот осуществляется через зонд с прокалыванием крышки, содержимое пробирок автоматически перемешивается. Назначение заданий и передача результатов осуществляются через ЛИС. Встроенный сканер штрих-кодов, большой сенсорный дисплей и русифицированное меню облегчают работу лаборанта. Ресурс хроматографической колонки увеличен вдвое, а стабильность рабочих реагентов составляет один месяц. Производителю удалось соединить в «DS 360» все достоинства референсного метода анализа и высокую экономичность исследований. Прибор зарегистрирован в Росздравнадзоре, имеет сертификат соответствия ГОСТ и, без сомнения, займет достойное место в арсенале передовых лабораторий нашей страны.

#### Литература

1. NGSP. Factors that Interfere with HbA1c Test Results. <http://www.ngsp.org/factors.asp>.
2. Mongia S.K., Little R.R., Rohlfing C.L., Hanson S., Roberts R.F., Owen W.E., D'Costa M.A., Reyes C.A., Luzzi I., Rober W.L. Effects of Hemoglobin C and S Traits on the Results of 14 Commercial Glycated Hemoglobin Assays // *Am. J. Clin. Pathol.* 2008; 130: 136–140.
3. NGSP. List of NGSP certified methods (updated 3/12, listed by date certified). <http://www.ngsp.org/prog/methods.pdf> (Accessed March 2012).
4. Sakurabayashi I., Watano T., Yonehara S., Ishimaru K., Hirai K., Komori T., Yagi M. New enzymatic assay for glycohemoglobin // *Clin. Chem.* 2003; 49 (2): 269–274.
5. Lenters-Westra E., Slingerland R.J. Six of eight Hemoglobin A1c Point-of-Care instruments do not meet the general accepted analytical performance criteria // *Clin. Chem.* 2010; 56 (1): 44–52.
6. American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations: Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes-2010 *Diabetes Care.* 2010; 33 (suppl. 1): 4–5.

## ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

**В.С. СУХОРУКОВ**

**ФГУ МНИИ педиатрии и детской хирургии Минздравсоцразвития РФ, г. Москва**

**Резюме.** В статье обосновывается актуальность развития широкого спектра методов лабораторной диагностики митохондриальных болезней и вторичных полисистемных митохондриальных нарушений. Рассмотрены основные проблемы разработки и внедрения молекулярно-генетических, биохимических, цитохимических и морфологических методов выявления полисистемной митохондриальной недостаточности.

**Ключевые слова:** митохондрии, митохондриальные нарушения, молекулярно-генетическая диагностика, биохимическая диагностика, цитохимическая диагностика, морфологическая диагностика.

## PROBLEMS OF MITOCHONDRIAL INSUFFICIENCY DIAGNOSIS

**V.S. SUKHORUKOV**

**Federal State Institution Moscow Scientific Research Institute of Pediatrics and Pediatric Surgery  
Ministry of Health Care and Social Development, Russian Federation, Moscow**

**Summary.** The article is devoted to the actual problem of laboratory diagnosis in mitochondrial diseases and secondary multisystemic mitochondrial disturbances. The main problems, concerning both working out and introduction into clinical practice of wide spectrum of methods (molecular-genetic, biochemical, cytochemical and morphological) are discussed. All these methods can be used for diagnosis of multisystemic mitochondrial insufficiency.

**Key words:** mitochondriae, mitochondrial disturbances, molecular-genetic diagnostics, biochemical diagnostics, cytochemical diagnostics, morphological diagnostics.

### Данные для корреспонденции:

Сухоруков Владимир Сергеевич — д. м. н., профессор,  
зав. научно-исследовательской лабораторией общей патологии  
ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии» Минздравсоцразвития РФ;  
тел.: +7 (495) 483-40-01, e-mail: vsukhorukov@inbox.ru

Наши знания о роли субклеточных процессов в гомеостазе и гомеорезе целостного организма, в реализации его саногенетических возможностей, наконец, в закономерностях патогенетических реакций, растут с огромной скоростью. Ежегодно появляются новые данные, существенно дополняющие (а иногда и меняющие) наши представления о внутриклеточных регуляторных молекулярных цепочках, специализации мембранных доменов, взаимодействии органелл и об иерархии генетических и эпигеномных процессов. Накопление новой информации с закономерной периодичностью переводит наши знания на новый уровень, что предьявляет и новые методологические вызовы. А ответные разработки часто имеют не только академические, но и практически значимые последствия, важные для диагностической медицины. Яркий пример — появление нового т. н. «цитобиохимического» метода, разработанного классиком отечественной биохимии М.Н. Кондрашовой из Пушинского института биофизики [1]. В основе этого метода лежит синтез биохимических и морфологических подходов, позволивший перейти на новый уровень анализа

тонких физиологических и адаптационных процессов в клетке.

Одно из ведущих направлений в области изучения внутриклеточных процессов — исследование митохондрий. Эти органеллы цитоплазмы, облигатные для эукариот, выполняют многочисленные функции, среди которых поддержание гомеостаза кальция и мочевой кислоты, синтез стероидов, участие в противовирусной защите, процессы, контролирующие клеточную дифференцировку и запуск апоптоза. Однако указанные, причем далеко не все перечисленные, функции существенно уступают в нашем сознании тому огромному значению, которое имеют митохондрии в организации внутриклеточного энергообмена.

Не удивительно, что медицинское значение митохондрий по мере развития науки получает все большее обоснование. Сравнительно немного времени прошло с момента принципиального изменения наших представлений в этой области. Ровно 50 лет назад впервые было описано заболевание, причиной которого было предположительное нарушение митохондриальных функ-

ций [2]. И сравнительно недавно, в 1988 году, в нескольких независимых работах были получены доказательства первичной этиологической роли мутаций митохондриальной ДНК в развитии конкретных нозологических форм [3–6]. С тех пор наши знания о заболеваниях, обусловленных первичными повреждениями митохондрий, быстро прогрессируют, число клинических фенотипов при этом превысило 80, а количество этиологически значимых мутаций, по данным сайта MITOWEB, приближается к тремстам. Еще шире круг патологических состояний, при которых нарушения митохондрий называют «вторичными» [7]. Среди таких заболеваний: синдром хронического утомления, мигрени, кардиомиопатии, гликогенозы, болезни соединительной ткани, полисистемные аутоиммунные заболевания, диабет, рахит, тубулопатии, панцитопения, гипопаратиреоз, печеночная недостаточность и многие другие. Умеренные нарушения клеточной энергетики (энергодифицитный диатез) могут не проявляться в виде самостоятельного заболевания, однако сказываются на характере течения других болезней.

Естественно, в такой ситуации активно изучаются технологические возможности медицины в области курации митохондриальных заболеваний. При этом актуальность развития новых диагностических методов не вызывает сомнений. Этот путь перспективен, он связан с появлением многообещающих подходов. Многочисленные проблемы, некоторые из которых перечислены ниже, затрудняют быстрый прогресс, хотя и заставляют нас искать новые технологии.

### Генетическая диагностика

Так называемые «первичные» митохондриальные болезни, изучение которых составляет ядро митохондриальной медицины, во многом обязаны нашим знаниям о них достижениям генетики. Молекулярно-генетические методы выявления митохондриальных болезней не просто являются инструментом диагностической медицины. Они, как правило, определяют сам факт существования нозологической формы заболевания. Соответственно и рассмотрение проблем диагностики логично начать с генетических методов.

Актуальность молекулярно-генетической диагностики подчеркивается значительной распространенностью (1:6000) генетически обусловленных митохондриальных болезней, трудно диагностируемых или вообще не выявляемых клиническими методами. В связи с этим использование молекулярно-генетических методов диагностики митохондриальных болезней потенциально эффективно для дифференциальной диагностики при обследовании детей с недифференцированными признаками задержки физического и интеллектуального развития, больных с клинически неясными формами нарушений психики, энцефалопатий, нервномышечных нарушений, кардиомиопатий, многих заболеваний органов чувств и внутренних органов.

Сложность молекулярно-генетического изучения митохондриальных болезней заложена в самой природе последних, определяемой мутациями как ядерных генов, так и генов, находящихся в ДНК самой митохондрии. И хотя благодаря обнаружению и изучению митохондриальной ДНК (митДНК) митохондриальные болезни и были описаны, именно наличие внеядерного генома представляет основные диагностические трудности. Дело в том, что в каждой клетке содержатся тысячи митохондрий, а на одну митохондрию приходится от пяти до десяти копий митДНК. Последняя наследуется от матери и не подвергается рекомбинации. Таким образом, вероятные мутации митДНК могут сосуществовать в клетке (и в организме в целом) с неизменными (дикими) копиями, определяя существование феномена, называемого гетероплазмией. Причем в онтогенезе мутантные копии достаются бластомерам, зародышевым листкам и формирующимся тканям и органам в случайном количестве. То есть распределение мутантных митДНК по организму мозаично. Патогенез заболевания в таком случае будет зависеть от количественного соотношения мутантных и диких копий (степени гетероплазмии), конкретного варианта мозаичности, энергозависимости пораженных клеток и, конечно, от характера мутаций.

На сегодня описано более 200 клинически значимых точечных мутаций митДНК. Они подразделены на две группы: мутации структурных генов (мРНК) и мутации, приводящие к нарушению белкового синтеза (тРНК и рРНК) (табл. 1). При этом клинические фенотипы ранжированы от мягких поздно дебютирующих состояний (сенсоневральная тугоухость, окулярная миопатия и сахарный диабет) до разрушительных и часто фатальных инфантильных заболеваний (синдром Ли). Кроме того, описано большое количество более крупных перестроек

**Таблица 1. Основные митохондриальные заболевания, связанные с дефектами митДНК**

Мутации рРНК и тРНК
— MELAS, MERRF, MIMAC, «офтальмоплегия+», диабет, кардиомиопатии
Мутации иРНК
— б-нь Лебера, «атаксия-ретинит»
Делетции
— с-м Кернса–Сейра, с-м Пирсона, «диабет+глухота», врожденная миоглобинурия, «офтальмоплегия+»
Дупликации
— Полиорганные синдромы раннего возраста

Обозначения: рРНК — рибосомальная РНК; тРНК — транспортная РНК; иРНК — информационная РНК; MELAS — митохондриальная энцефалопатия, лактат ацидоз, инсультоподобные эпизоды; MERRF — миоклонус эпилепсия, рваные красные волокна; MIMAC — матерински наследуемая миопатия, кардиомиопатия

митДНК, характер которых также имеет диагностическое значение.

Следовательно, митохондриальная медицина нуждается в развитии методов молекулярно-генетической диагностики, способных не только охватить максимально возможный спектр мутаций митДНК, но и определить степень гетероплазии в отношении выявленных нарушений. Максимально продуктивным в этом отношении было бы, вероятно, использование 24-капиллярных генетических анализаторов и анализаторов ПЦР с детекцией флуоресценции в режиме реального времени.

Важно учитывать, что митДНК определяет строение всего 2% митохондриальных белков, то есть вероятность наличия этиологически значимых мутаций в ядре значительно выше (табл. 2). Вероятно, более 80% всех наследственных митохондриальных заболеваний связано с ядерными мутациями [8, 9]. Для их диагностики, в свою очередь, видимо, наиболее эффективны полногеномные анализаторы.

**Таблица 2. Митохондриальные заболевания, связанные с дефектами ядерной ДНК**

Структурные гены
– синдром Ли, дефекты I, II и III комплексов дыхательной цепи митохондрий
Неструктурные гены
– гены сборки дыхательных комплексов (синдромы с ранним дебютом)
– гены стабильности митДНК (синдромы Альперса, SANDO, MNGIE, деплеции митДНК)
– гены митохондриального импорта (синдром Мора–Транебьорга)
– гены митохондриального белкового синтеза (фатальная гепатоэнцефалопатия или COXPD1)
– гены гомеостаза железа (атаксия Фридрейха, ASAT)
– гены шаперонов (спастическая параплегия)
– другие гены (синдромы Барта, СМТ, AD-оптической атрофии, СНН, этилмалоновая ацидурия)

Обозначения: MNGIE – мионейрогастроинтестинальная энцефалопатия; SANDO – сенсорная атаксическая невропатия, дизартрия и офтальмопарез; COXPD1 – комбинированная недостаточность окислительного фосфорилирования 1-го типа; ASAT – сидеробластная анемия и спинномозжечковая атаксия; СМТ – болезнь Шарко–Мари–Туа; AD – аутосомно-доминантная; СНН – гипоплазия хряща и волос.

Кроме того, тщательное изучение вариантов митДНК (гаплотипов) и распределение их по так называемым гаплогруппам выявило их корреляцию с рисками самых различных заболеваний: митохондриальных, психических, неврологических, сердечно-сосудистых, эндокринных, онкологических; наконец, с резистентностью к инфекционным заболеваниям и с продолжительностью жизни [10; 11]. Если так, то определение индивидуальной принадлежности больного к той или иной гаплогруппе по типу митДНК – потенциально ценный инструмент профилактической медицины.

Таким образом, чрезвычайно важно, в том числе в нашей стране, развитие централизованных молекулярно-генетических лабораторий, способных решать вышеперечисленные задачи дифференциальной диагностики генетически обусловленных нарушений тканевого энергообмена.

### Биохимическая диагностика

Биохимические методы анализа полисистемных дисэнергетических состояний имеют большое значение в диагностике митохондриальных болезней, хотя часто малоспецифичны и требуют уточняющих исследований (табл. 3 и 4).

**Таблица 3. Лабораторное выявление митохондриальной недостаточности. I этап — подозрение**

Сахар крови	снижение или повышение уровня
Гемоглобин А1С	повышение уровня
Электролиты крови	дефицит анионов
Лактат крови	повышение уровня
Формула крови	анемия, тромбоцитопения, нейтропения
Аммиак плазмы	повышение натоцак
Анализ мочи	повышение рН
Органические кислоты	нарушения спектра
Кетоны	кетоз после еды

**Таблица 4. Лабораторное выявление митохондриальной недостаточности. II этап — подтверждение**

Лактат и пируват	повышение уровня
Лактат/пируват	> 20
Аминокислоты	повышение уровня аланина, аминоацидурия
Органические кислоты	повышение уровня продуктов цикла Кребса или 3-метилглютаконовой кислоты
Карнитин и ацилкарнитины	снижение уровня в крови или моче
Кетоны	кетоз после еды
Ацилглицины мочи	Изменения при нарушениях β-окисления

Обсуждая неспецифические методы лабораторной диагностики, следует обратить внимание на диагностические возможности определения концентраций молочной и пировиноградной кислот. Их определение в дина-



мике при нагрузочных пробах значительно более диагностически ценно, чем выявление по одной точке. А главное — необходимо определение обоих параметров одновременно с определением коэффициента «лактат/пируват», значительно более важного для дифференциальной диагностики митохондриальных заболеваний. Между тем, в большинстве крупных лабораторий определяется только концентрация лактата.

Большой диагностический потенциал имеет определение соотношения в крови общего и свободного карнитина. Этот хромато-масс-спектрометрический метод благодаря внедрению в нашей стране программ и технологий неонатального скрининга стал в последние годы достаточно доступен. Как показали исследования, проведенные в нашей лаборатории И.В. Золкиной и И.С. Мамедовым, у детей, не имеющих клинических и лабораторных признаков дефицита карнитина, коэффициент «общий карнитин/свободный карнитин» не превышает 0,6–0,7, в то время как полисистемная митохондриальная недостаточность часто сопровождается его значительным увеличением.

Выявление значительных нарушений со стороны комплексов митохондриальной дыхательной цепи входит в число основных критериев диагностики митохондриальных заболеваний. Почти у половины пациентов с митохондриальными болезнями в тканях обнаруживается изолированный дефицит 1 комплекса дыхательной цепи, приблизительно у 1/3 — комбинированный дефицит нескольких комплексов, у 1/4 — изолированный дефицит 4 комплекса дыхательной цепи. Изолированная недостаточность 3 комплекса и особенно 2 комплекса дыхательной цепи встречаются редко [12]. Однако, несмотря на диагностическую ценность этих определений, которая подчеркивается важностью получаемых результатов для выбора тактики энерготропной терапии, такие исследования в нашей стране практически не проводятся. Отчасти это можно объяснить отсутствием современного полярографического оборудования в клинических лабораториях, отчасти — инвазивностью процедуры, проводимой на биопсийном материале мышц, печени и фибробластах. Кроме того, получаемые на выделенных *in vitro* митохондриях результаты, очевидно, существенно отличаются от соответствующих параметров, характерных для этих оргanelл в живой клетке [1].

### Морфологическая диагностика

Одним из оснований самого появления понятия о митохондриальных болезнях были успехи их морфологической диагностики, в первую очередь, описание в 1963 году (т.е. спустя год после первого описания митохондриального заболевания) [13] феномена *RRF* (“ragged” redfibers, «рваных» или «шероховатых» красных волокон) — мозаично разбросанных скелетно-мышечных волокон с аномальными скоплениями митохондрий под сарколеммой и между миофибриллами.

Выявление этого феномена считается одним из основных диагностических доказательств наличия так называемых «первичных» митохондриальных синдромов. Данные световой микроскопии подкрепляются электронно-микроскопическими описаниями изменений количества и ультраструктуры митохондрий, и морфологические методы занимают одно из ведущих мест в диагностике митохондриальных болезней. Их значимость тем более высока, что выявление митохондриальных изменений в скелетной мышце вовсе не обязательно свидетельствует о наличии только митохондриальной миопатии, а является тестом на существование общей полисистемной митохондриальной патологии.

В 90-е годы XX века значение морфологической диагностики, казалось, стало снижаться в связи с распространением методов молекулярно-генетической диагностики митохондриальных синдромов. Возник вопрос: не изжила ли себя связанная с относительно травматичной биопсией процедурой морфологическая диагностика митохондриальных болезней? Немалую роль в некотором снижении интереса к морфологической диагностике сыграло высказываемое многими исследователями мнение о том, что *RRF* являются прямым следствием мутаций митохондриальной ДНК. Тогда непосредственному выявлению таких мутаций молекулярными методами, конечно, должно было быть отдано предпочтение. Тем не менее, в настоящее время можно сказать, что этого так и не произошло. Во-первых, из-за относительно низкой диагностической чувствительности молекулярно-генетической диагностики (отсутствие положительного ответа при поиске тех или иных мутаций вовсе не означает отсутствие других вариантов мутаций генов митохондриальных белков, да и известна на сегодняшний день лишь малая часть таких генов). Во-вторых, многие данные свидетельствуют, что пролиферация митохондрий, лежащая в основе образования *RRF*, отражает в большей степени компенсаторную реакцию в ответ на полисистемную и гетерогенную митохондриальную недостаточность. Более того, эта пролиферация может представлять собой универсальный механизм адаптации тканей к функциональной недостаточности [14]. Тогда наличие *RRF* должно быть не равнозначно наличию мутантной митохондриальной ДНК и являться более широким относительно охвата клинических состояний тестовым показателем.

В этом же отношении принципиально отметить следующее: хотя в большинстве источников соответствующей литературы и признается необходимость определения относительного количества *RRF* среди мышечных волокон, каждое такое «шероховатое» волокно однозначно воспринимается как качественный феномен. А ведь выраженность скоплений митохондрий в каждом таком образовании может быть совершенно разной. Мы в своей работе уже давно применяем 4-балльную оценку степени выраженности отдельных *RRF* (1 балл — только умеренные субсарколеммальные скопления метки;

2 балла — умеренные субсарколеммальные и умеренные интермиофибрилярные скопления метки; 3 балла — грубые субсарколеммальные и умеренные интермиофибрилярные скопления метки; 4 балла — грубые субсарколеммальные и грубые интермиофибрилярные скопления метки). Кроме того, для обобщенной оценки морфологических проявлений митохондриальных нарушений нами предложен показатель — «митохондриальный индекс», включающий качественную и количественную оценку *RRF*, а также характеристику гистохимической активности митохондриальных ферментов в мышце. Все это оказалось существенным для дифференциальной диагностики митохондриальных нарушений. Следует заметить, что в зарубежных работах также постепенно приходят к необходимости более дифференцированного подхода к морфологии *RRF*. Так, часто последнему понятию противопоставляется термин «субсарколеммальные скопления митохондрий», который соответствует нашему представлению об *RRF*, выраженностью в 1–2 балла.

Помимо прямой оценки митохондриальных функций с помощью гистохимического выявления активности митохондриальных ферментов в мышце, применение других возможностей гистологического исследования позволяет оценить и косвенные проявления митохондриальной недостаточности. К последним относятся, в частности, накопления (особенно субсарколеммальные) гликогена и липидов — субстратов энергообмена, а также микроконгломератов солей кальция, отложение которых свидетельствует о митохондриальной недостаточности (одна из функций митохондрий — перераспределение излишков кальция в клетке). Наконец, чрезвычайно информативным является изучение ультраструктурных дефектов митохондрий с помощью электронного микроскопа.

Аналогичные структурно-функциональные изменения, в частности гетерогенные аномальные скопления митохондриальных конгломератов, выявлены нами и в других системах организма (гладкие мышцы, почки), что позволяет рассматривать их как объект прикладной диагностики и как возможную модель для биологических исследований клеточной энергетики.

### Цитохимическая диагностика

Сравнительная простота и малая травматичность взятия и обработки крови объясняет интерес к цитохимическому анализу активности митохондриальных ферментов лимфоцитов для диагностики полисистемных митохондриальных нарушений. Ранее в совместном с группой Р.П. Нарциссова исследовании этих показателей у больных с разными формами митохондриальной недостаточности нами была выявлена достоверная корреляция параметров лимфоцитарных гранул и показателей митохондриальной недостаточности в скелетной мышце [15]. Таким образом, у многих больных с полисистемной митохондриальной недостаточностью диа-

гностическая биопсия мышц может быть заменена цитохимическим анализом клеток периферической крови.

Получаемые нами данные свидетельствуют о клинической значимости как простого визуального подсчета гранул, так и компьютерного морфометрического анализа их различных параметров. При этом наиболее диагностически ценным является выявление активности сукцинатдегидрогеназы,  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы. Для более точной дифференциальной диагностики нами совместно с нашими сотрудниками Н.В. Клейменовой, Т.В. Виноградовой, Е.В. Тозлиян и Е.И. Шабельниковой разработаны методы морфометрии цитохимических препаратов, позволяющие отличать, во-первых, проявления полисистемного энергодефицита от неспецифической реактивности митохондрий в лимфоцитах при иммуностимуляции и, во-вторых, признаки «первичных» митохондриальных болезней от «вторичных» полисистемных изменений энергообмена.

Комплексный цитохимический анализ является ценным диагностическим инструментом при подборе медикаментозного лечения и при оценке динамики митохондриальной недостаточности в процессе терапии. Чувствительность вышеупомянутых показателей позволяет уже вскоре после первого назначения препарата сделать вывод о его эффективности и прогнозировать результат лечения. Очевидно, что морфометрическая оценка изучаемых гранул при различных формах митохондриальной недостаточности также может иметь не только прикладное, но и общетеоретическое значение для изучения цитофизиологии клеточной энергетики.

Нормативы показателей активности митохондриальных ферментов для лимфоцитов представлены в таблицах 5 и 6. Умеренное отклонение какого-либо из цитохимических показателей (в том числе их коэффициентов) от представленных референтных пределов может расцениваться как доказательство наличия энергодефицитного диатеза. Отклонение показателей за пределы двух сигмальных отклонений более вероятно представляет собой лабораторное проявление митохондриальной недостаточности.

Очевидно, значительной перспективой для митохондриальной медицины является внедрение упомянутого в начале статьи цитобioхимического метода [1, 16]. Этот метод создан на основе сочетания метода Р.П. Нарциссова и современных биохимических подходов с использованием сред, приближенных по составу к внутриклеточной среде.

По мнению М.Н. Кондрашовой (устное сообщение), как маркер состояния митохондрий он гораздо чувствительнее, чем принятые биохимические методы. В частности, с его помощью можно определять активность отдельных комплексов дыхательной цепи, что позволяет не ставить на повестку дня вопрос о расширении внедрения более инвазивных и чреватых большим количеством артефактов полярографических методов.

**Таблица 5. Показатели активности митохондриальных ферментов и лактатдегидрогеназы (у.е.; средние значения) в лимфоцитах периферической крови (визуальная оценка) у здоровых детей**

	Возраст детей				
	Новорожденные	До 1 года	1–4 года	5–12 лет	13–18 лет
Сукцинатдегидрогеназа	12,7 ± 0,86	15,9 ± 0,88	16,7 ± 0,72	20,6 ± 0,83	20,1 ± 0,56
α-глицерофосфат-дегидрогеназа	4,67 ± 0,84	7,8 ± 0,72	8,5 ± 0,38	12,5 ± 0,56	12,4 ± 0,48
Глутаматдегидрогеназа	4,92 ± 0,75	8,0 ± 0,70	8,7 ± 0,53	12,4 ± 0,83	12,6 ± 0,80
Лактатдегидрогеназа	12,8 ± 0,86	15,2 ± 1,67	13,1 ± 1,56	13,5 ± 1,14	13,4 ± 1,59

**Таблица 6. Пределы показателей активности митохондриальных ферментов и лактатдегидрогеназы (у.е.) и их соотношений в лимфоцитах периферической крови (визуальная оценка), выход за которые позволяет предполагать наличие энергодефицита детей**

	Возраст детей				
	Новорожденные	До 1 года	1–4 года	5–12 лет	13–18 лет
Сукцинатдегидрогеназа (СДГ)	10,1–15,3	13,3–18,6	14,5–18,8	18,0–23,0	18,5–21,5
α-глицерофосфат-дегидрогеназа	2,2–7,2	5,6–9,9	7,5–9,5	11,0–14,0	11,0–14,0
Глутаматдегидрогеназа (ГДГ)	2,7–7,2	7,5–11,7	7–10	10,0–15,0	10,0–15,0
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	10,1–15,3	10,0–20,0	8,0–18,0	10,0–17,0	10,0–17,0
Коэффициент ГФДГ/СДГ (К1)	0,14–0,7	0,4–0,7	0,4–0,55	0,5–0,7	0,5–0,7
Коэффициент ГДГ/СДГ (К2)	0,18–0,7	0,4–0,75	0,4–0,65	0,6–0,8	0,6–0,8
Коэффициент ГФДГ/ГДГ (К3)	0,3–2,7	0,55–1,2	0,8–1,35	0,7–1,2	0,7–1,2
Коэффициент ЛДГ/СДГ (К4)	0,66–1,0	0,9–1,2	0,6–0,9	0,5–0,8	0,6–0,8

### Неинвазивная диагностика

Необходимость обследования широкого круга условно здоровых лиц с особой остротой ставит на повестку дня вопрос о минимизации инвазивности при проведении медицинских исследований. В связи с этим нами для изучения индивидуальных особенностей энергообмена был предложен метод с использованием чрескожного мониторинга газообмена с помощью транскутанного монитора (патент РФ № 2442535). Для чрескожного измерения парциальных давлений кислорода и углекислого газа мы использовали транскутанный монитор ТСМ 4 производства компании Radiometer (Дания), а в качестве нагрузочной пробы — L-карнитин (лекарственный препарат Элькар производства ООО «ПИК-ФАРМА», представляющий собой 20% раствор левокарнитина, в дозе 1 чайная ложка перорально после определения базовых уровней газообмена).

При нормальных показателях энергообмена кривая рО<sub>2</sub> в период со 2-й по 6-ю минуты после нагрузки умеренно повышается, а затем возвращается к базовому уровню.

Отсутствие такого повышения или снижение кривой свидетельствуют об энергодефиците. Для уточнения его

степени возможно продолжение мониторинга до 30 минут. Степень понижения значения рО<sub>2</sub> в период мониторинга коррелирует, по нашим наблюдениям, с выраженностью энергодефицитного состояния [17].

Полученные данные подтверждают возможность применения чрескожного мониторинга параметров газообмена в качестве неинвазивного метода обследования для выявления нарушений клеточного энергообмена. Следовательно, данный метод диагностики энергодефицитных состояний весьма перспективен и после стандартизации может быть рекомендован для внедрения в клиническую практику.

### Заключение

Представленные в предыдущих разделах данные охватывают только небольшую часть информации об используемых и потенциально эффективных методах исследования митохондриальных функций. В то же время актуальность выявления дизэнергетических состояний различного рода требует значительной интенсификации исследований в этом направлении. Эта актуальность особенно подчеркивается наличием многочисленных форм лекарственных препаратов и биодобавок, воздействующих на различные стороны митохондриальной

активности. Подобные воздействия, конечно, не могут быть эффективными без соответствующей диагностической базы. Очевидно, что указанная интенсификация может идти по двум направлениям. Во-первых, это разработка новых, минимально инвазивных и максимально чувствительных и специфичных методов диагностики полисистемной митохондриальной недостаточности. А во-вторых, это расширение внедрения уже разрабо-

танных, в том числе и некоторых из вышеперечисленных методов. Последнее — не просто, требует большой научной работы (в частности, по стандартизации методик и накоплению референтной базы данных), а также значительных организационных усилий. Однако многое сегодня позволяет надеяться, что усилия эти окажутся не напрасными.

### Литература

1. Kondrashova M., Zakharchenko M., Khunderyakova N. Preservation of the in vivo state of mitochondrial network for ex vivo physiological study of mitochondria // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009; 41: 2036–2050.
2. Luft R., Ikkos D., Palmieri G., Ernster L., Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of non-thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study // *Journal Clin. Investigation*. 1962; 41: 1776–1804.
3. Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies // *Nature* 1988; 331: 717–719.
4. Wallace D.C., Singh G., Lott M.T. et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy // *Science* 1988a; 242: 1427–1430.
5. Wallace D.C., Zheng X., Lott M.T. et al. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease // *Cell*. 1988b; 55: 601–610.
6. Zeviani M., Moraes C.T., DiMauro S. et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Seyre syndrome // *Neurology*. 1988; 38: 1339–1346.
7. Сухоруков В.С. Очерки митохондриальной патологии. М.: ИД «Медпрактика-М», 2011: 288.
8. Uusimaa J., Finnila S., Remes A.M. et al. Molecular epidemiology of childhood mitochondrial encephalomyopathies in a Finnish population: sequence analysis of entire mtDNA of 17 children reveals heteroplasmic mutations in tRNAArg, tRNAGlu, and tRNALeu(UUR) genes // *Pediatrics*. 2004; 114 (2): 443–450.
9. Uusimaa J., Remes A., Rantala H. et al. Childhood encephalopathies and myopathies: a prospective study in a defined population to assess the frequency of mitochondrial disorders // *Pediatrics*. 2000; 105 (3): 598–603.
10. Wallace D.C. Mitochondria as Chi // *Genetics*. 2008; 179: 727–735.
11. Pierron D., Letellier T., Grossman L. Mitogroup: Continent-specific clusters of mitochondrial OXPHOS complexes based on nuclear non-synonymous polymorphisms // *Mitochondrion*. 2012; 12: 237–241.
12. Thornburn D.R., Chow C.W., Kirby D.M. Respiratory chain enzyme analysis in muscle and liver // *Mitochondrion* 2004; 4: 363–375.
13. Engel W.K., Cunningham G.G. Rapid examination of muscle tissue: An improved trichrome stain method for fresh frozen biopsy sections // *Neurology* 1963; 13: 919–926.
14. Sukhorukov V.S. Quantitative Alterations in Mitochondria: Adaptation Contra Violation // *Adaptation Biology and Medicine (Volume 6: Cell Adaptations and Challenges)* / Ed. P. Wang, C.-H. Kuo, N. Takeda and P.K. Singal. Narosa Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, India, 2011: 77–89.
15. Сухоруков В.С., Нарциссов Р.П., Петричук С.В. и др. Сравнительная диагностическая ценность анализа скелетной мышцы и лимфоцитов при митохондриальных болезнях // *Архив патологии*. 2000; 62 (2): 19–21.
16. Захарченко М.В. Сохранение митохондриальной сети как основы для исследований участия митохондрий в физиологической регуляции: автореф. дисс. ... к.б. н. Пушино, 2012.
17. Белов В.А., Сухоруков В.С. Неинвазивная диагностика энергодефицитного состояния у детей с хроническим тонзиллитом // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2011; 56 (5): 85–87.



## КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ НЕЙРОНАЛЬНОГО ЛИПОФУСЦИНОЗА 1-ГО ТИПА (СИНДРОМА САНТАВУОРИ–ХАЛТИА)

М.А. БУЛАТНИКОВА<sup>1</sup>, О.А. КУЗНЕЦОВА<sup>1</sup>, К.Г. БУСЛОВ<sup>1</sup>, В.И. ЛАРИОНОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия

Клиника психоневрологии СПбГПМА

<sup>2</sup> ФГБУ Научно-исследовательский детский ортопедический институт им. Г.И. Турнера

Минздравсоцразвития России, г. Пушкин

**Резюме.** Нейрональные липофусцинозы — группа нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся полиморфной картиной прогрессирующих неврологических синдромов, тяжелой фармакорезистентной эпилепсией, часто дополняемой кортикальным миоклонусом, быстро прогрессирующими когнитивными нарушениями, регрессом достигнутых навыков, потерей зрения за счет атрофии зрительных нервов. Частые эпилептические приступы, мышечная гипотония и атаксия — наиболее распространенные симптомы в дебюте заболевания. Нейрональные цероидные липофусцинозы — наследственные моногенные заболевания, относятся к лизосомным болезням накопления. Специфическим гистохимическим маркером для всей группы цероидных липофусцинозов является внутрилизосомальное накопление ШИК-положительного материала, дающего аутофлуоресценцию в зелено-желтом спектре длиной 340–360 нм. К настоящему времени общепринята классификация цероидных липофусцинозов с выделением девяти основных форм, обусловленных мутациями в различных генах и различающихся по характерному возрасту дебюта и особенностям клинической картины. Для нейронального цероидного липофусциноза первого типа (синдром Сантавуори–Халтия, ранняя младенческая форма нейронального цероидного липофусциноза) наиболее характерным является дебют от 6 до 24 мес., хотя описаны случаи позднего дебюта — в младшем школьном, юношеском возрасте, у взрослых. Заболевание обусловлено мутациями в гене PPT-1, который кодирует фермент пальмитоил-протеин тиоэстеразу. Отличительными клиническими особенностями классического течения — младенческой формы являются быстрое прогрессирование с потерей достигнутых навыков в течение второго года жизни, полиморфные эпилептические приступы, раннее уплощение пиков на ЭЭГ, выраженная корково-подкорковая атрофия, смешанная заместительная гидроцефалия по данным МРТ, атрофические изменения на глазном дне, иногда симптом «вишневой косточки». К специфическим подтверждающим методам диагностики относятся оценка активности пальмитоил-протеин тиоэстеразы и молекулярно-генетические методы. В заключение приведен пример классического течения нейронального липофусциноза первого типа, подтвержденного методами ферментной диагностики.

**Ключевые слова:** нейрональный цероидный липофусциноз, НЦЛ 1, синдром Сантавуори–Халтия, пальмитоил-протеин тиоэстераза, эпилепсия, нейродегенеративные заболевания.

## CLINICAL OBSERVATION OF 1<sup>ST</sup> TYPE NEURONAL LIPOFUSCINOSIS (SANTAVUORI–HALTIA SYNDROME)

М.А. BULATNIKOVA<sup>1</sup>, М.А. KUZNETZOVA<sup>1</sup>, К.Г. BUSLOV<sup>1</sup>, V.I. LARIONOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budget Educational Institution “Saint-Petersburg State Pediatric Medical Academy”, Ministry of Health Care and Social development of Russian Federation, Clinics of psychoneurology

<sup>2</sup> Federal Budget Institution Scientific Research G.I. Turner Pediatric Orthopedic Institute, Ministry of Health Care and Social Development of Russian Federation, Pushkin

**Summary.** Neuronal lipofuscinoses is a group of neurodegenerative diseases characterized by polymorphic manifestations of progressive neurological syndromes, severe pharmacoresistant epilepsy, often accompanied by cortical myoclonus, rapidly progressive cognitive disorders, regression of the obtained habits, vision loss due to optic nerves atrophy. Frequent epilepsy attacks, muscular hypotension and ataxia are the most prevalent symptoms in the onset of the disease. Neuronal ceroid lipofuscinoses are hereditary monogenous diseases of the group of lysosome storage diseases. Specific histochemical marker of all the group of ceroid lipofuscinoses is the accumulation of PAS-positive material in lysosomes. This material fluorescents in green-yellow spectrum with the wave length 340–360 nm. Modern classification of ceroid lipofuscinoses includes 9 different forms which are due to different genes mutations. These diseases differ in age of onset and clinical picture peculiarities. For 1st type of neuronal ceroid lipofuscinoses (Santavuori–Haltia disease, early infancy form of neuronal ceroid lipofuscinoses)

*the onset in age of 6 to 24 month is typical. However later onset is described in patients of early school age, adolescents and even adults. The disease is due to the mutations in PPT-1 gene encoding the enzyme palmitoil-protein thioesterase. Classic clinical peculiarities typical for the infancy variant are rapid progression with the loss of the obtained habits during the second year of life, polymorphic epileptic attacks, early changes of EEG peaks, marked cortical-subcortical atrophy, mixed replacing hydrocephaly according to MRI results, atrophic changes of the retina, sometimes the "cherry" sign. Specific methods confirming the diseases are the activity of palmitoil-protein thioesterase and molecular genetic methods. The clinical case example of patient with classic course of the disease is described. In this case the diagnosis was confirmed by methods of enzyme diagnostics.*

**Key words:** neuronal ceroid lipofuscinosis, 1st type neuronal lipofuscinosis, Santavuori–Haltia syndrome; palmitoil-protein thioesterase, epilepsy, neurodegenerative diseases.

### Данные для корреспонденции:

Булатникова Марина Алексеевна, врач-невролог,  
клинический ординатор кафедры нервных болезней  
Санкт-Петербургской государственной педиатрической медицинской академии  
194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская д. 2,  
e-mail: sirusbm@gmail.com, тел.: 8-965-088-26-75

Нейрональные цериодные липофусцинозы (НЦЛ) — группа нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся прогрессирующими когнитивными нарушениями, регрессом достигнутых психомоторных навыков, тяжелой фармакорезистентной эпилепсией, неврологическими расстройствами мультисистемного характера, обычно с мышечной гипотонией и атаксией на ранних стадиях, снижением зрения, прогрессивным течением. При гистохимическом исследовании выявляется внутрилизосомальное накопление липопигмента, дающего аутофлюоресценцию в зелено-желтом спектре длиной 340–360 нм [1, 2]. Заболевание получило название «цериодный липофусциноз» за сходство гистохимических свойств накапливаемого пигмента с пигментами старения липофусцином и цериодом [1, 2, 3]. К развитию цериодных липофусцинозов могут приводить наследственные мутации, затрагивающие функции по меньшей мере 10 различных белков. В соответствии с этими данными и характерным возрастом дебюта заболевания построена современная классификация нейрональных цериодных липофусцинозов [1, 2].

НЦЛ 1-го типа (CLN 1, синдром Сантавуори–Халтия, младенческая форма; OMIM #256730) обусловлен гомозиготными или компаундными гетерозиготными мутациями в гене PPT-1, кодирующем фермент пальмитоил-протеин тиоэстеразу (ЕС 3.1.2.22). В норме этот фермент расщепляет дисульфидные связи на пальмитированных белках, отщепляя липидный остаток. Для НЦЛ 1-го типа характерно внутрилизосомальное накопление сапозинов А и D, активаторов ферментов, расщепляющих сфинголипиды [2, 4, 6]. Патогенетические механизмы заболевания исследованы недостаточно полно. При снижении активности пальмитоил-протеин тиоэстеразы пальмитированные белки пресинаптической мембраны нарушают реутилизацию компонентов экскретированного в синаптическую щель содержимого везикул [7]. По последним данным, снижение активности пальмитоил-протеин-тиоэстеразы уже во внутри-

утробном периоде нарушает нормальное развитие коры головного мозга [5].

Наследование НЦЛ 1-го типа — аутосомно-рецессивное. Для классической формы НЦЛ 1-го типа характерен дебют в возрасте от 6 мес. до 2 лет, в большинстве случаев до года. Описаны единичные случаи дебюта в позднем детском, юношеском периоде и у взрослых [1, 2, 8, 9]. Частой анамнестической находкой является темповая задержка психомоторного развития на первом году жизни до появления других симптомов заболевания. В течение второго года жизни происходит быстро прогрессирующая потеря достигнутых психомоторных навыков, прогрессирующее снижение зрения, роста головы, развитие тяжелой фармакорезистентной эпилепсии с полиморфными, миоклоническими, фокальными приступами. Наблюдается мышечная гипотония, которая постепенно сменяется повышением тонуса по пирамидному, экстрапирамидному или смешанному типу [1, 2, 3]. Для синдрома Сантавуори–Халтия по мере прогрессирования неврологических расстройств характерно присоединение миоклонуса и других гиперкинезов: элементов хорей, атетоза, дистонии, двигательных стереотипий. Некоторые больные имеют мягкие гарголоидные черты [1, 2, 3].

Частота синдрома Сантавуори–Халтия в Финляндии составляет 1:20 000, в других странах Европы и Северной Америке — не установлена [2]. Дифференциальная диагностика проводится с синдромом Ретта, нейроаксональной дистрофией, некоторыми формами эпилептических энцефалопатий, в частности, синдромами Драве и Веста, которые дебютируют эпилептически приступами с регрессом достигнутых психомоторных навыков в этом же возрасте [6].

При ЭЭГ-исследовании выявляется раннее уплощение пиков. Это считается патогномичным признаком синдрома Сантавуори–Халтия. На МРТ головного мозга обычно наблюдаются глубокая корково-подкорковая атрофия, наружная и внутренняя гидроцефалия, а на

поздних стадиях — снижение интенсивности сигнала от бугров таламуса в Т2-режиме [1, 3, 10]. На МРТ также могут выявляться признаки гипоплазии коры лобных и височных долей, проявляющиеся схожей с МР-картиной «изъеденного яблока» при глутаровой ацидурии, что обусловлено нарушением формирования коры головного мозга внутриутробно. Подобные находки согласуются с представлениями о внутриутробном начале патологического процесса НЦЛ 1-го типа [2]. У нескольких больных с ранним дебютом НЦЛ 1-го типа описано возникновение субдуральных гигром, происхождение которых остается неясным [3]. При осмотре глазного дна может быть выявлен феномен «вишневой косточки» в области макулы, но такая картина глазного дна наблюдается редко, более характерным и постоянным признаком является прогрессирующая атрофия зрительных нервов. Кроме того, симптом «вишневой косточки» неспецифичен для НЦЛ 1-го типа, так как наблюдается при многих лизосомных болезнях накопления с прогрессирующим поражением ЦНС (НЦЛ 2-го типа, НЦЛ 3-го типа, сиалоидоз, галактосиалоидоз, болезнь Тея–Сакса, младенческие формы Gm1-ганглиозидоза, болезнь Салла).

В настоящее время для подтверждения диагноза НЦЛ 1-го типа используются методы ферментной диагностики, при которых производится определение активности пальмитоил-протеин тиоэстеразы в фибробластах или лимфоцитах крови, а также молекулярно-генетические методы, направленные на выявление мутаций в гене PPT-1 [1, 2, 3, 11].

Гистохимическое исследование занимает промежуточное положение между методами специфической и неспецифической диагностики НЦЛ 1-го типа. Выявление в препаратах лейкоцитов гепаринизированной крови, биоптатах кожи или конъюнктивы внутрилизосомальных скоплений ШИК-положительного материала, дающего аутофлюоресценцию в зелено-желтом спектре длиной 340–360 нм, подтверждает, что заболевание относится к группе нейрональных липофусцинозов, но не позволяет определенно судить о типе заболевания [1, 3, 4].

Электронная микроскопия позволяет дифференцировать формы внутрилизосомальных включений, более характерных для отдельных конкретных форм нейронального липофусциноза. В частности, для НЦЛ 1-го типа характерно наличие гранулярных осмофильных включений, для поздней инфантильной классической формы (Бильшовского–Янского) — преимущественно криволинейных телец, при ювенильной форме преобладают включения в форме отпечатков пальцев [1, 12]. Тем не менее, метод не является строго специфичным и на современном этапе в диагностике синдрома Сантавуори–Халтиа играет вспомогательную роль.

Ферментная диагностика является точным, специфичным и общепринятым методом подтверждающей диагностики для НЦЛ 1-го типа. Активность фермента

пальмитоил-протеин тиоэстеразы измеряется в лейкоцитах, получаемых из гепаринизированной крови, или в фибробластах кожи. Также разработан метод определения активности пальмитоил-протеин тиоэстеразы в ворсинах хориона, что позволяет проводить пренатальную диагностику этого заболевания [11].

Для получения корректных результатов ферментной диагностики чрезвычайно важен преаналитический этап. Образцы биоматериала должны быть доставлены в лабораторию не позднее 24 часов с момента взятия в специальном биоконтейнере с постоянной температурой +4–6° [11].

Также для подтверждения диагноза НЦЛ 1-го типа применяются молекулярно-генетические методы. Материалом для проведения молекулярно-генетического анализа может служить ДНК пробанда, выделенная из лейкоцитов крови или сухого пятна крови на банке из фильтровальной бумаги, культуры фибробластов, клеток буккального эпителия, а также ворсин хориона (в пренатальной диагностике). Методы ДНК диагностики подразделяются на методы, ориентированные на поиск известных мутаций, и методы, ориентированные на поиск ранее неизвестных мутаций. В первом случае диагноз подтверждается при обнаружении у пробанда гомозиготной мутации или гетерозиготной компаундной мутации. Методы, ориентированные на поиск ранее неизвестных мутаций, среди которых основное место занимает секвенирование, применяются при обнаружении известной мутации в гетерозиготном состоянии или при отсутствии известных мутаций. Целесообразно проведение молекулярно-генетической диагностики для самого пробанда, а также для его родственников, с целью предупреждения появления новых случаев заболевания в семье.

Ниже мы приводим пример классического течения НЦЛ 1-го типа, подтвержденного двукратным определением активности пальмитоил-протеин тиоэстеразы.

Больной Е.А., 2 г. 6 мес., в октябре 2011 г. поступил в стационар с жалобами на утрату ранее приобретенных психомоторных и психоречевых навыков: перестал ходить, садиться, ползать, речи нет; ежедневные судорожные приступы с девиацией глаз вверх, в сторону, вверх и в сторону, кратковременным слюнотечением, иногда обмяканием. Реже наблюдались клонические судороги правой руки, миоклонические приступы. Также мать предъявляла жалобы на ухудшение контакта «глаза в глаза». Ребенок от второй беременности, первая беременность завершилась медицинским абортom. Родители не состоят в кровнородственном браке, в семье нет случаев аналогичного заболевания, как и других наследственных болезней обмена. Беременность протекала с явлениями позднего гестоза, на фоне хламидиоза и частых ОРЗ. Роды срочные, дискординация родовой деятельности, экстренное кесарево сечение. Апгар — 7/8 баллов. Вес — 3750 гр., длина — 51 см. Период адаптации без особенностей. Развивался с незначительной темповой задержкой: голову держит с 2,5 мес., сел в 7 мес., стал

ползать в 10–11 мес., встал у опоры в 11 мес., самостоятельная ходьба, первые слова с 1 г. 2 мес. В марте 2011 (1 г. 6 мес.) переболел ветряной оспой. Во время болезни стал легко возбудим, перестал вставать. После болезни не восстановился: стал вялым, перестал ходить, интересоваться игрушками, в апреле появились гиперкинетические приступы в форме быстрых «молниеносных кивков головы». В июне–июле перестал садиться, ползать, отмечалась выраженная плаксивость, участились приступы — до 15–20 в течение дня. С июля мать обратила внимание на то, что ребенок перестал фиксировать взгляд на предметах. В августе появились приступы остановки взора с тоническим напряжением конечностей, с тоническим напряжением руки, а также приступы с поворотом головы и глаз вправо, ночные вздрагивания. Производился подбор противоэпилептической терапии из препаратов первой линии без значимого влияния на частоту приступов и общее состояние пациента. В сентябре произведена МРТ, где выявлена заместительная наружная и внутренняя гидроцефалия, заболевание расценено как лейкоэнцефалит. Начато лечение преднизолоном, на фоне которого приступы стали реже — до двух-трех в течение дня, ребенок стал спокойнее. При поступлении в психоневрологическое отделение СПбГПМА в ноябре 2011 наблюдались судорожные приступы полиморфного характера, чаще в форме атонических абсансов и фокальных моторных пароксизмов до 7–8 раз в течение суток. Синдром гипервозбудимости ЦНС. Стереотипные движения головы (мотание головой), рук. Окружность головы 47 см. Взгляд фиксирует плохо. Слюнотечение. Плохо жует, иногда поперхивается. Сухожильные рефлексы оживлены, справа несколько выше. Слева симптом Бабинского, с двух сторон симптом Россолимо. Опоры на стопы нет. Будучи присаженным, заваливается вбок, вперед, назад. Не стоит и не ходит. Предметы рукой не берет. Мягкие гарголоидные черты в сочетании с кушингоидными. В анализе крови — умеренно увеличен холестерин. На ЭКГ синусовая брадиаритмия. На ЭЭГ — значительные диффузные изменения биоэлектрической активности головного мозга. Кривая ЭЭГ уплощена. Регистрируется низкоамплитудный бета-ритм в сочетании с полиморфной тета-активностью. На МРТ — резко выраженные признаки корково-подкорковой атрофии, с преобладанием атрофических изменений в височных и базальных лобных отделах неокортекса, заместительная смешанная гидроцефалия, повышен сигнал от таламусов. По данным УЗИ внутренних органов — гепатомегалия, по данным осмотра офтальмолога — частичная атрофия зрительных нервов. Выполнена тандемная масс-спектрометрия сухого пятна крови — данных за аминокислотурии, органические ацидурии, дефекты бета-окисления не получено. На фоне проводимой комбинированной противоэпилептической терапии (фенобарбитал, кепсра) в сочетании с гормональной терапией (преднизолон) наблюдалось уменьшение частоты приступов, больной стал эмоционально активнее; в то же время ухудшилась фиксация взора, появился спонтанный нистагм, эпизодически отмечался повышенный по центральному типу мышечный тонус, больной перестал переворачиваться. В январе 2012 — учащение приступов, появление клонических и тонико-клонических приступов. В феврале 2012 был гос-

питализирован повторно. В неврологическом статусе — отрицательная динамика: плавающие движения глазных яблок, частые эпизоды спонтанного нистагма, умеренное повышение мышечного тонуса по центральному типу в нижних конечностях, патологические стопные знаки с двух сторон. Не переворачивается. Ухудшился ночной сон. По данным ЭЭГ — отрицательная динамика: кривая резко-уплощенная, регистрируется низкоамплитудный бета-ритм, что характерно для синдрома Сантавуори–Халтия. Предположен диагноз НЦЛ 1, в дифференциальном диагнозе рассматривалась атипичная форма GM2-ганглиозидоза, НЦЛ 2 с ранним началом. На базе МНГЦ РАМН лаборатории наследственных болезней обмена выполнено исследование активности ферментов пальмитоил-протеин тиоэстеразы и бета-галактозидазы с двукратным контролем, выявлено значительное снижение активности пальмитоил-протеин тиоэстеразы, характерное для НЦЛ 1-го типа. На фоне гормональной терапии препаратами АКТГ отмечалось снижение частоты приступов без влияния на общее состояние пациента. На основании клинических данных и данных специфической ферментативной диагностики установлен диагноз синдрома Сантавуори–Халтия.

В приведенном клиническом наблюдении отмечалась ранняя манифестация заболевания, развернутая клиническая картина проявилась на фоне инфекционного заболевания (ветряная оспа). По этой причине появление неврологической симптоматики было расценено как следствие инфекционного процесса. Тем не менее, характерные клинические проявления, прежде всего неврологического плана, позволили заподозрить синдром Сантавуори–Халтия.

Таким образом, применение методов подтверждающей диагностики является необходимым, что обусловлено трудностями клинического разграничения атипичных форм нейронального липофусциноза между собой, с другими нейродегенеративными, в том числе некоторыми лизосомными ферментами накопления, симптоматическими формами эпилептических энцефалопатий, а также задачами медико-генетического консультирования. Ферментная диагностика является высокоинформативным и доступным в клинической практике методом диагностики нейронального липофусциноза 1-го типа.

### Литература

1. Михайлова С.В., Захарова Т.Ю., Петрухин А.С. Нейрометаболические заболевания у детей и подростков: диагностика и подходы к лечению. М.: Литера, 2011.
2. Santavuori P., Vanhanen S.L., Autti T. Clinical and neuro-radiological aspects of neuronal ceroid lipofuscinosis disorders // Eur. J. Paediatr. Neurol. 2001; Suppl. A: 157–161.
3. Levin S.W., Baker E.H., Gropman A. et al. Subdural fluid collections in patients with infantile neuronal ceroid lipofuscinosis // Arch. Neurology. 2009, 66: 1567–1571.
4. Junaid M.A., Pullarkat R.K. Biochemistry of neuronal lipofuscinosis // Adv. Genet. 2001; 45: 93–106.



5. *Suopan K.J., Partanen S., Ezzaki J.* et al. Developmental changes in the expression of neuronal lipofuscinosis-linked proteins // *Mol. Genet. Metab.* 2000; 71: 190–194.

6. *Hofman S.L., Atoshband A., Cho S.K.* Neuronal ceroid lipofuscinosis caused by defects in soluble lysosomal enzymes (CNL1 and CNL2) // *Curr. Mol. Med.* 2002; 2: 423–437.

7. *Antianen L., Luiro K., Kauppi M.* Palmitoyl protein thioesterase 1 (PPT1) deficiency causes endocytic defects connected to abnormal saposin processing // *Exp. Cell. Res.* 2006 May. 15; 312 (9): 1540–1553.

8. *Simonati A., Tessa A., Bernardina B.D.* Variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis because of CLN1 mutations // *Pediatr. Neurol.* 2009 Apr; 40 (4): 271–276.

9. *Kälviäinen R., Eriksson K., Losekoot M.* et al. Juvenile-onset neuronal ceroid lipofuscinosis with infantile CLN1 mutation and

palmitoyl-protein thioesterase deficiency // *Eur. J. Neurol.* 2007 Apr; 14 (4): 369–372.

10. *Kamate M., Hattiholi V.* Novel neuroimaging finding in palmitoyl protein thioesterase-1-related neuronal ceroid lipofuscinosis // *Pediatr. Neurol.* 2012 May; 46( 5): 325–328.

11. *Young E.P., Worthington V.C., Jackson M.* et al. Pre- and postnatal diagnosis of patients with CLN1 and CLN2 by assay of palmitoyl-protein thioesterase and tripeptidyl-peptidase I activities // *Eur. J. Pediatr. Neurol.* 2001; 5 (Suppl A): 193–196.

12. *Mitchison H.M., Hofmann S.L.* Mutations in the palmitoyl-protein thioesterase gene (PPT; CLN1) causing juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis with granular osmiophilic deposits Becerra CH // *Hum. Mol. Genet.* 1998 Feb; 7 (2): 291–297.

**Уважаемые читатели  
журнала «КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ»!**

Сообщаем Вам, что на журнал «Клинико-лабораторный консилиум» проводится подписка по каталогу «Газеты. Журналы» ОАО «Агентство «Роспечать».

Подписной индекс для организаций и частных лиц — **80381**.

Также подписаться на журнал Вы можете, отправив письмо-запрос на электронную почту [ejvcons@mail.ru](mailto:ejvcons@mail.ru).

Электронная версия журнала публикуется:

— на официальном сайте Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова.

Режим доступа: [http://www.spb-gmu.ru//index.php?option=com\\_content&task=view&id=832&Itemid=774](http://www.spb-gmu.ru//index.php?option=com_content&task=view&id=832&Itemid=774)

— на сайте научной электронной библиотеки [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru).

## ОРФАННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

### По материалам конференции

«Редкие и наследственные болезни — междисциплинарная проблема»

28 февраля 2012 года, Санкт-Петербург

**М.В. ИВАНЧЕНКО**

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России

Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины

***Резюме.** 28 февраля 2012 года в Санкт-Петербурге состоялась конференция «Редкие и наследственные болезни — междисциплинарная проблема». Информацию об организаторах и участниках и программу конференции можно найти на сайте благотворительного фонда для больных муковисцидозом «Острова» по адресу <http://ostrovary.com/новости-фонда/302/>.*

***Ключевые слова:** орфанные заболевания, конференция, информационный портал, медицинский генетик, хроническое прогрессирующее заболевание.*

## ORPHAN DISEASES

**M.V. IVANCHENKO**

Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education

“Saint-Petersburg State Pavlov Medical University”,

Ministry of Health Care and Social Development,

Chair of clinical laboratory diagnosis with the course of molecular medicine

***Summary.** 28 of February 2012 in Saint-Petersburg the scientific conference «Rare and hereditary diseases – interdisciplinary problem» took place. Information concerning the organizers and the program can be found on a website of charity foundation for patients with cystic fibrosis «Isles»: <http://ostrovary.com/новости-фонда/302/>.*

***Key words:** orphan diseases, conference, information portal, medical genetics, chronic progressive disease.*

### Данные для корреспонденции:

Маргарита Владимировна Иванченко,

аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития РФ,

тел.: 8-905-269-77-67, [ritaivanchenko@gmail.com](mailto:ritaivanchenko@gmail.com)

В 2008 году медицинские эксперты Европейского Союза (ЕС) предложили отмечать 29 февраля праздник под девизом «очень редкий день для особенных людей». В последний день февраля в мире ежегодно проходят мероприятия, приуроченные ко Дню редких (орфанных) заболеваний.

Согласно статье 44 Федерального закона № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан Российской Федерации», редкими (орфанными) являются жизнеугрожающие и хронически прогрессирующие заболевания с распространенностью не более 10 случаев на 100 тысяч населения, приводящие к сокращению продолжительности жизни граждан или их инвалидности. Статья 44 также содержит указания о создании Перечня орфанных заболеваний (ОЗ), который в настоящее время включает 24 нозологических единицы, и о порядке ведения Регистра ОЗ.

1. В России при участии общественных организаций и медицинского сообщества создан и действует (в данный момент в тестовом режиме) информационный портал о редких заболеваниях <http://www.rarediseases.ru/>. На сайте выделены основные проблемы оказания помощи пациентам с ОЗ, в частности — отсутствие дееспособного регистра больных редкими заболеваниями (медицинский архив — это не регистр!).
2. Отсутствие регистра медицинских учреждений, в которых есть условия для диагностики и лечения таких заболеваний, и специалистов, имеющих опыт в этой области.
3. Недостаток качественной доступной информации и научных знаний о редких заболеваниях.
4. Ограниченность или отсутствие возможностей для диагностики большинства редких заболеваний.

5. Наличие трудностей в получении доступа к лечению, если таковое существует.
6. Отсутствие протоколов ведения больных по большинству заболеваний.
7. Отсутствие образовательных программ для врачей первичного звена по редким заболеваниям.
8. Если нет диагностики, регистрации и протоколов ведения больных, то нет и оснований для выделения денег из бюджета для их лечения.
9. Недостаточно эффективная, негибкая система лекарственного обеспечения.
10. Отсутствие законов, регулирующих ситуацию с редкими болезнями и лекарствами для их лечения.
11. Отсутствие работающей системы планирования и гибкого мониторинга ситуации с редкими заболеваниями.
12. Недостаточное взаимопонимание, взаимодействие и координация между органами государственной власти, медицинскими и социальными работниками и больными.
13. У государства до последнего времени не было политической воли для решения данной проблемы, у чиновников на местах — желания, у врачей — возможности ее решать, а у больных — веры в то, что ситуацию можно изменить.

В.И. Ларионова (ГБОУ ВПО СПбГПМА Минздравсоцразвития России) во вступительном слове подчеркнула, что для улучшения сегодняшней ситуации в области ОЗ необходимы как внутримедицинская, так и междисциплинарная кооперация, создание рабочих групп, формирование образовательных программ для подготовки специалистов, и обратила внимание на диссонанс между научными достижениями и медицинской практикой в рамках проблемы ОЗ.

По словам А.А. Соколова (Санкт-Петербург, Институт экспериментальной медицины), одного из учредителей информационного центра [garediseases.ru](http://garediseases.ru), в развитых странах схема решения проблемы ОЗ начинается с издания законов, затем создаются исполнительные органы, затем — базы данных (регистры) и, наконец, легитимные организованные группы (общественные организации). В Российской Федерации наблюдается обратная ситуация: пациентские движения набирают силу, и медицинское сообщество необходимо «подтягивать» за ними. В США законы-модели лечения ОЗ появились в 1980-х годах, в ЕС — в 2000 году. В 2010 году подобный пакет законов был принят в Китае. Эксперты ВОЗ начали работу над созданием Международной классификации болезней №11, в которой будет выделена группа ОЗ. Основная информационная база ОЗ на мировом уровне, Orphanet, в настоящее время содержит около шести тысяч заболеваний, соответствующих определению орфанных. База объединяет сведения из национальных регистров и обеспечивает взаимодействие специалистов из разных стран и сфер жизни.

А.Ю. Асанов (Москва) сообщил, что методы генной терапии, например, с использованием микроинтерферирующих РНК, в течение следующих 7–8 лет обеспечат революцию в терапии ОЗ. Генетика — это методологическая основа медицины, и 90% редких заболеваний имеют наследственную природу. При этом внимания медицинской генетике и молекулярной биологии при подготовке медицинского персонала уделяется явно недостаточно. Биологи, напротив, обладают в данных областях обширными знаниями, однако, в связи со сложностями трудоустройства в диагностические лаборатории, не всегда могут их применить.

Доклад представителя Московского университета им. Сеченова (замещал Р.В. Курынина) о Центре инновационных образовательных программ в профессиональной подготовке врачей продемонстрировал пример удачного решения подобного междисциплинарного несоответствия. На базе Университета открыта инновационная образовательная программа для студентов-медиков и фармакологов, которые учатся совместно. Приоритетными направлениями программы являются персонализированная медицина, GCP и GLP, бизнес-модели в медицине, используется принцип научных пар (медик-фармаколог). В Центре молодые ученые, аспиранты, студенты и профессорско-преподавательский состав объединены одной рабочей площадкой и имеют общее грантовое обеспечение.

Л.В. Лязина (Санкт-Петербург, Медико-генетический диагностический центр) напомнила участникам конференции, что в МГЦ с 1969 г. существует «бумажный» регистр хромосомных и врожденных патологий. В Федеральном законе № 323-ФЗ есть определение Регистра ОЗ и список полей для внесения информации о пациенте. Необходимо унифицировать формат регистров, региональные регистры должны включать те же сведения, что и федеральный. Специалисты МГЦ оказывают квалифицированную помощь после установления диагноза, однако оно возможно далеко не во всех случаях. Необходимо создание рабочих и экспериментальных групп и центров экспертизы случаев ОЗ по нозологиям. Ни один образец не должен поступать в лабораторию без предварительного обследования пациента. План обследования пациентов должен быть четко алгоритмирован. Необходимо отслеживать данные пациентов, чтобы не дублировать тесты, и координироваться с производителями реактивов. Вопросы взаимодействия с врачебно-трудовой экспертной комиссией и страховыми компаниями и развития реабилитационной медицины для больных ОЗ нуждаются в отдельном обсуждении. В заключение Л.В. Лязина подчеркнула, что для регистрации случая ОЗ в региональном регистре в течение 10 дней после установления диагноза необходимо предоставить информацию в МГЦ.

Л.М. Щугарева (Санкт-Петербург, Детская городская больница № 1) рассказала о роли магнитно-резонансной томографии в диагностике врожденных нару-

шений обмена, прежде всего, синдрома Лея и болезни Александера, а А.Ю. Рудник (Санкт-Петербург, Военно-Медицинская академия) сделала сообщение об ОЗ, имеющих офтальмологические проявления, синдроме Марфана, Вагнера–Стиклера, окуло-дермальном меланозе.

По словам Е.М. Королевой (Санкт-Петербург, Центр доказательной медицины), в Санкт-Петербурге не хватает хроматографов для первичных этапов диагностики, во многих лабораториях нет даже спектрофотометров. С другой стороны, существует проблема нерационального использования имеющегося оборудования: большинство лабораторий предлагают одну-две методики, и нет специалистов, способных в полном объеме обслуживать хроматографы. Е.М. Королева сделала вывод, что рядом с врачом должны быть биолог и цитогенетик, а с врачом-лаборантом — медицинский физик или химик.

М.Д. Терехова, представитель пациентского движения, рассказала о социальных аспектах помощи больным ОЗ. В 2011 году прошло две конференции с участием пациентов, в ноябре было создано Всероссийское общество ОЗ. Все зарегистрированные пациенты получают терапию в необходимых дозах. Одним из приоритетных направлений работы Общества является создание школы для пациентов в регионах РФ. Информация также доступна на сайте [rarediseases.ru](http://rarediseases.ru).

С.Е. Хальчицкий (Санкт-Петербург, Детская областная больница) снова подчеркнул необходимость углубления генетического образования среди врачей. Он обратил внимание на проблемы осуществления программы неонатального скрининга. В настоящее время четыре из пяти заболеваний программы можно диагностировать при помощи молекулярных методов, однако сохраняются трудности внедрения их в практику. В течение восьми месяцев лаборатория не получала финансирования. Лечебное питание для детей с фенилкетонурией, предоставляемое государством, не содержит тетрагидробиоптерина (необходимый компонент), и родители вынуждены покупать его самостоятельно за рубежом.

Резюмируя идеи, высказанные участниками, и подводя итоги прошедшей конференции, для улучшения ситуации в области орфанных заболеваний в Северо-Западном регионе необходимы:

- обучение медицинских генетиков (в настоящее время в России их не более 250);
- интеграция медицинского и биологического образования и совместная работа специалистов;
- унификация формы и содержания регистров ОЗ на региональном и федеральном уровнях,

развитие преимущества детских и взрослых баз;

- передача сведений о новых случаях ОЗ в Регистр Медико-генетического диагностического центра в течение 10 дней после установления диагноза;
- проведение совместного заседания неврологов, офтальмологов и педиатров по проблемам ОЗ;
- активное использование информационной базы [rarediseases.ru](http://rarediseases.ru).

На сайте будут опубликованы перечень и контактная информация учреждений, осуществляющих диагностику и терапию, а также алгоритмы ведения пациентов по нозологиям в Санкт-Петербурге.

Лаборатория клинической иммунологии и молекулярной медицины СПбГМУ имени акад. И.П. Павлова принимает активное участие в работе группы Санкт-Петербурга по проблемам врожденных иммунодефицитов. Встречи группы происходят на регулярной основе третий четверг каждого месяца. Лаборатория удостоена правом получения гранта Правительства Санкт-Петербурга в сфере научной и научно-технической деятельности с проектом «Иммунологическая диагностика общего переменного иммунодефицита как основа рациональной фармакотерапии редких заболеваний» (2011 год) и в молодежном научно-инновационном конкурсе У.М.Н.И.К. (2012 год) с проектом «Лабораторная диагностика общей переменной иммунной недостаточности». Авторский коллектив награжден за лучший инновационный проект в сфере науки и высшего профессионального образования Санкт-Петербурга в 2011 году с проектом в номинации «Лучшая научно-инновационная идея» «Общий переменный иммунодефицит: доказательная диагностика редких заболеваний». Разработаны новые лекции по биологии общей переменной иммунной недостаточности и по иммунофенотипическому профилю субпопуляций В-клеток в рамках цикла повышения квалификации на факультете последиplomного образования СПбГМУ имени акад. И.П. Павлова. Работа проводится при серьезном взаимодействии с другими учеными Санкт-Петербурга и Москвы. Первые результаты представлены на встречах рабочей группы по проблемам первичных иммунодефицитов, на заседании VI и VII Всероссийской школы с международным участием по проточной цитометрии, на II международной конференции по редким заболеваниям и редко применяемым технологиям «Линия жизни».



## ПРЕСЕПСИН — НОВЫЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ БИОМАРКЕР СЕПСИСА

**В.В. ВЕЛЬКОВ**

**ЗАО «ДИАКОН», Московская область**

**Резюме.** Научный обзор, посвященный пресепсину (ПСП) — новому и весьма перспективному маркеру сепсиса. Рассматриваются патофизиологический механизм образования пресепсина при активации макрофагов и при фагоцитозе и связь уровней ПСП с тяжестью сепсиса. Основная цепь событий, ведущих к синтезу ПСП, такова:

а) мембранный рецептор моноцитов / макрофагов *mCD14* после связывания с эндотоксинами активирует провоспалительный ответ и затем

б) отщепляется от макрофагов и в растворимой форме (как *sCD14*) выходит в циркуляцию;

в) после активации фагоцитоза лизосомальные протеиназы расщепляют *sCD14* с образованием фрагмента *sCD14-ST*, который получил название пресепсин.

Многочисленные исследования показывают, что ПСП является специфическим маркером сепсиса и быстро повышается в ответ на повышение его тяжести. При воспалительных процессах, не связанных с фагоцитозом, ПСП не повышается.

Поскольку ПСП — это гуморальный фактор, выделяемый фагоцитами при фагоцитозе, его использование весьма перспективно не только для диагностики и мониторинга сепсиса, но и для научных исследований, включающих выявление факторов, стимулирующих или ингибирующих фагоцитоз при различных патологиях, а также для поиска (скрининга) препаратов, влияющих на фагоцитоз.

**Ключевые слова:** пресептин, сепсис, эндотоксины, фагоцитоз, воспаление, моноциты, макрофаги.

## PRESEPSIN — NEW HIGHLY EFFECTIVE SEPSIS BIOMARKER

**V.V. VELKOV**

**ZAO "DIAKON", Moscow region**

**Summary.** Scientific review devoted to presepsin, a new and perspective marker of sepsis is given. The pathophysiological mechanism of presepsin synthesis in case of macrophages activation and phagocytosis are discussed. The links between the presepsin level and sepsis severity are described. The main chain of events leading to presepsin synthesis is following:

a) membrane receptor of monocytes/macrophages *mCD14* after the linkage with endotoxins activates proinflammatory response;

b) the soluble form (*sCD14*) is split from macrophages and comes to circulation;

c) after phagocytosis activation the lysosomal proteinkinases split *sCD14* with formation of *sCD14-ST* fragment which is called presepsin.

Numerous investigations show that presepsin is a specific marker of sepsis and rapidly increases in response of increase of its severity. In inflammatory processes not related to phagocytosis there is no increase of presepsin.

Because presepsin is a humoral factor produced by phagocytes during phagocytosis, its using is perspective not only for diagnosis and monitoring of sepsis but also for scientific purposes including the revealing of factors stimulating and depressing of phagocytosis in different diseases as well as in the investigations related to searching and synthesis of drugs influencing on phagocytosis.

**Key words:** presepsin, sepsis, endotoxins, phagocytosis, inflammation, monocytes, macrophages.

### Данные для корреспонденции:

Вельков Василий Васильевич, к. б. н., директор по науке ЗАО «ДИАКОН»,  
142290, Московская обл., г. Пушкино, пр. Науки, 5, тел.: (905)501-82-05, e-mail: vvv@diakonlab.ru

### Актуальность ранней и точной диагностики сепсиса

Каждый год в мире регистрируется 18 миллионов случаев сепсиса, 30% из них заканчиваются летальным исходом [1]. Надежды, что с развитием санитарно-гигиенических мер динамика сепсиса пойдет вниз, оказа-

лись тщетными. Только в США с 1979 по 2000 г. среди 750 млн случаев госпитализации зарегистрировано 10 319 418 случаев сепсиса. Ежегодный прирост частоты сепсиса — 8,7%, от 164 000 в 1979 г. (82,7 на 100 000 человек) до 660 000 в 2000 г. (240,4 на 100 000 человек).

50% летальных исходов в американских отделениях интенсивной терапии происходят именно из-за сепсиса [2]. Одна из основных причин этой удручающей картины — трудности своевременной и точной постановки диагноза сепсиса.

### Лабораторная диагностика сепсиса: успехи и проблемы

**ССВО** (синдром системного воспалительного ответа) диагностируется при наличии двух или более признаков из четырех: 1) лейкоцитоз  $>12\ 000$  или  $<4000$  в 1 мкл; либо относительное количество их незрелых форм  $>10\%$ ; 2) частота сердечных сокращений  $>90$  в мин; 3) частота дыхания  $>20$  в мин; 4) температура тела  $>38^\circ$  или  $<36^\circ\text{C}$ , 5) *отсутствие системной инфекции*.

*Возможные причины ССВО:* 1) тяжелые травмы; 2) хирургическое вмешательство и его осложнения; 3) ожоги; 4) острый панкреатит; 5) иммунодефицит; 6) недостаточность адреналина; 7) легочная эмболия; 8) осложненная аневризма аорты; 9) геморрагия; 10) тампонада сердца; 11) анафилаксия; 12) передозировка лекарственных препаратов. *Осложнениями ССВО* могут быть: 1) синдром множественной дисфункции органов (СМДО), другое название — полиорганная недостаточность; 2) гипотензия, связанная с дилатацией сосудов; 3) гиповолемический шок.

**Сепсис** — *инфекция* (подтвержденная, например, результатами микробиологических посевов) *в сочетании с ССВО*.

**Тяжелый сепсис** — *сепсис в сочетании с множественной органной дисфункцией*, гипоперфузией либо гипотензией (гипоперфузия сопровождается, но не ограничивается лактацидозом, олигурией или нарушениями сознания).

**Септический шок** — *вызванная сепсисом гипотензия* (имеющая место, несмотря на адекватное восполнение жидкости) и признаки гипоперфузии органов и тканей.

*Гемокультуру* часто считают «золотым стандартом» в диагностике сепсиса. Однако ее результат поступает, как правило, через 3–7 дней. Более того, из-за применения антибиотиков, предшествовавшего взятию крови, гемокультура часто дает ложноотрицательный результат [3].

### Прокальцитонин (ПКТ) — маркер сепсиса с загадочным физиологическим механизмом

ПКТ был открыт в 1984 г. как предшественник (прогормон) кальцитонина. Кальцитонин — пептидный гормон, синтезируемый, в основном, парафолликулярными С-клетками щитовидной железы, а также в небольшом количестве и в других органах, наиболее заметно — в легких. Основная функция кальцитонина — уменьшение концентрации кальция в плазме за счет ускорения минерализации костной ткани. Повышение внеклеточного кальция стимулирует секрецию кальцитонина.

В норме ПКТ — это промежуточный продукт образования кальцитонина (препрокальцитонин  $\Rightarrow$  *прокальцитонин*  $\Rightarrow$  кальцитонин). Кроме этой, другой биологической функции он не имеет и в норме в крови практически не обнаруживается.

ПКТ *при воспалительных процессах* — *маркер сепсиса*. Если суммировать результаты многочисленных исследований, то текущая картина такова: при воспалительном процессе, вызванном бактериальными и грибковыми инфекциями, а также простейшими, уровень ПКТ в крови возрастает в течение 6–12 часов. При этом концентрация *кальцитонина не повышается*, то есть в данном случае ПКТ прогормоном кальцитонина не является. Существенно, что при инфекции:

- а) ПКТ вырабатывается *вне* щитовидной железы, в различных органах (в печени, почках, в адипоцитах и в мышцах) и разными типами клеток, в частности, паренхимальными;
- б) циркулирующий в крови ПКТ, в отличие от внутриклеточного, укорочен на 2 аминокислотных остатка с обоих концов молекулы, что соответствует участку от 2-го до 116-го аминокислотных остатков для «тиреоидного» ПКТ;
- в) синтез ПКТ индуцируется эндотоксинами;
- г) выбросу ПКТ предшествует повышение уровней провоспалительных цитокинов, в особенности ИЛ-6 и ФНО-альфа;
- г) повышение уровня ПКТ наступает через короткое время после пикового уровня цитокинов [см. обзоры 4–6].

Неожиданно оказалось, что повышение уровней ПКТ, происходящее параллельно с активацией острой фазы воспаления, связано с *утяжелением процесса*. Инъекция здоровым хомякам препарата человеческого ПКТ не приводила к заметным негативным последствиям, но у *животных с сепсисом* ПКТ повышал смертность в 2 раза. Введение анти-ПКТ-антисыворотки значительно повышало выживаемость инфицированных животных. Предполагается, что иммунонейтрализация ПКТ с помощью специфических иммуноглобулинов может быть средством терапии сепсиса [см. обзоры 4–5].

Таким образом, повышение сывороточных уровней ПКТ является эффективным показателем сепсиса, но физиологическая роль ПКТ в этом процессе остается загадочной («маркер есть, а понимания, как он работает — нет»). Нет и понимания того, чем вызваны как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты определения ПКТ как маркера сепсиса [7].

«*Ложноположительный*» ПКТ. Неспецифическое по отношению к инфекции повышение уровня ПКТ наблюдается при массовой гибели клеток. Действительно, после тяжелой травмы и хирургического вмешательства уровень ПКТ быстро повышается, а затем, при отсутствии инфекции, снижается и приходит к норме через 3–5 дней, в течение которых уверенно подтвердить или

исключить сепсис на основе анализа только ПКТ весьма проблематично [8, 9].

«*Ложноотрицательный ПКТ*». На ранних стадиях развития системной инфекции, пока она имеет еще локальный характер, уровни ПКТ низкие или повышены незначительно и находятся в «серой зоне». При развитии сепсиса повышение ПКТ происходит со значительной задержкой и не отражает динамику сепсиса on-line [7].

**Пресепсин — маркер сепсиса: высокочувствительный, высокоспецифичный и быстро отражающий его динамику**

Пресепсин (ПСП) — это белок, концентрация которого в крови быстро возрастает при развитии сепсиса. Кратко рассмотрим механизм образования ПСП и его значение.

*CD14 — мембранный белок макрофагов.* CD14 является рецептором, который «распознает» сигнал о наличии инфицирующих бактерий, включает систему неспецифического иммунитета и связанный с нею воспалительный процесс. mCD14 — мембранный гликопротеин (m — membrane) с молекулярной массой 55 Кда, имеет на С-конце «якорный» гликозилфосфатидилинозитол. В норме mCD14 экспрессируется на поверхности моноцитов/макрофагов, нейтрофилов, хондроцитов, В-клеток, дендритных клеток и других зрелых миелоидных клеток [10–12].

*mCD14 и бактериальные эндотоксины.* mCD14-рецептор связывается с различными бактериальными лигандами, в числе которых: а) компоненты грамотрицательных бактерий, основной из них — липополисахарид (ЛПС, эндотоксин, один из основных компонентов клеточной стенки), б) компоненты грамположительных бактерий, в) компоненты грибов [13–16]. mCD14 может самостоятельно связываться с ЛПС и включать сигнал активации макрофагов, но наличие специального липополисахарид-связывающего белка (ЛСБ, LBP — *lipopolysaccharide binding protein*) повышает эффективность такого связывания в 100–1000 раз. In vivo при низком уровне ЛПС (малом количестве бактерий, которое может быстро возрасти) ЛСБ заблаговременно «усиливает» сигнал для активации воспалительного ответа [17].

ЛСБ (молекулярная масса 50 кДа) считается белком острой фазы воспаления, синтезируется преимущественно в печени и выходит в кровоток в гликозилированном состоянии. При инфекции синтез ЛСБ повышается. ЛСБ является основным белком плазмы, ответственным за связывание эндотоксинов с mCD14 моноцитов/макрофагов [18].

**Липополисахарид-связывающий белок (ЛСБ): средство к большому спектру инфицирующих агентов**

Кроме эндотоксина грамотрицательных бактерий [18, 19], ЛСБ специфически связывается с компонента-

ми клеточной стенки: а) грамположительных бактерий — липотехойевые кислоты, пептидогликаны [15, 20], б) микобактерий — липопротейны, липоманнаны [13], в) микоплазм — липопептиды [21], г) спирохет — гликолипиды и липопротейны [14], д) грибов [16]. Таким образом, спектр микроорганизмов, активирующих воспалительный ответ, а при его недостаточности — вызывающих сепсис, весьма широк.

Рецептор mCD14, связавшийся с комплексом ЛСБ-ЛПС, активируется и передает сигнал корецептору TLR4, находящемуся рядом на мембране и относящемуся к т. н. толл-подобным рецепторам (Toll-like receptor), которые активируют неспецифический иммунитет. mCD14 находится на поверхности мембраны, TLR4 же — трансмембранный белок, пронизывающий клеточную стенку. Именно TLR4, активированный комплексом mCD14–ЛСБ–ЛПС, передает сигнал о бактериальной инфекции внутрь макрофага [22].

Через 30 мин после внесения ЛПС в цельную кровь начинает повышаться синтез mCD14, что вызывается непосредственным связыванием ЛПС с mCD14, индуцируется весьма малыми концентрациями ЛПС (10 пг/мл) пропорционально его дозе и достигает пика (уровня, превышающего исходный в 2 раза) между первым и третьим часом индукции [23]. В аналогичном исследовании было показано, что ЛПС повышает синтез mCD14 в 2,5 раза [24].

*sCD14.* После выполнения сигнальной функции mCD14 утрачивает свой «якорь» (гликозилфосфатидилинозитол), отсоединяется от мембраны, становится свободным (растворимым, s — soluble) и выходит в циркуляцию. sCD14 — это маркер ответа моноцитов на действие ЛПС [25]. В целом, повышение уровня sCD14 в крови связано с тяжестью воспаления и развитием септического шока [26]. У циркулирующего sCD14 и мембранного mCD14 функции отличаются: sCD14 в *отсутствие* эндотоксина способен индуцировать в моноцитах синтез важнейшего провоспалительного цитокина — ФНО-альфа [27].

Весьма существенно, что sCD14 является сигналом индукции воспаления для клеток, *не* имеющих mCD14 и поэтому не реагирующих на эндотоксины. Это т. н. «CD14-отрицательные клетки» — эндотелиальные, эпителиальные, гладкомышечные и некоторые другие; в них воспалительный процесс «включается» циркулирующим комплексом sCD14-ЛПС-ЛСБ [17, 28].

*Почему sCD14 не может быть маркером сепсиса?* Дело в том, что sCD14 повышается и при несептических состояниях — СПИД, синдроме острого респираторного дистресса, системной красной волчанке и многих других видах патологии [29, 30].

**Пресепсин (sCD14-ST) — укороченный sCD14**

В 2005 г. в крови септических пациентов была обнаружена ранее неизвестная форма sCD14. Было показано,

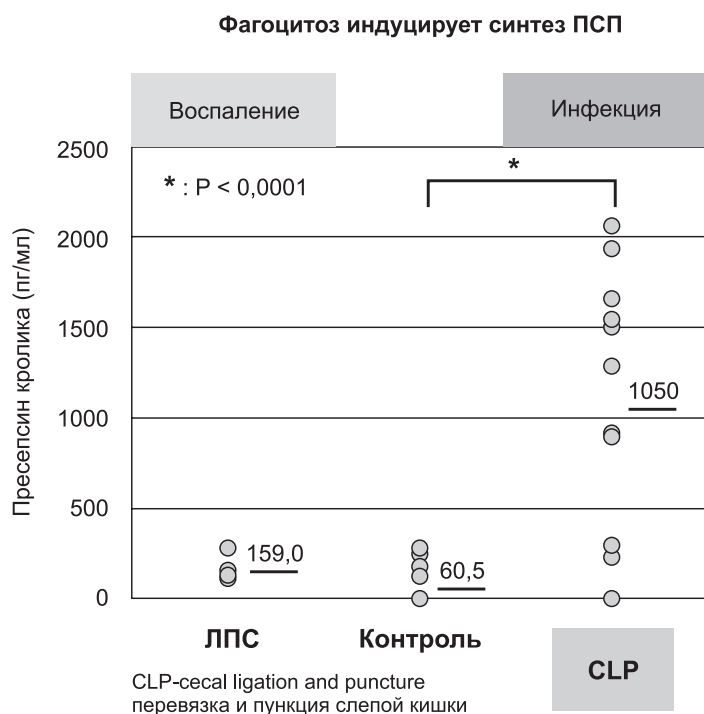


Рис. 1. Уровни ПСП при индукции воспаления и сепсиса у кроликов путем перевязки и пункции слепой кишки [33]

что при бактериальной инфекции в составе комплекса sCD14–ЛПС–ЛСБ под действием циркулирующей протеазы от sCD14 отщепляется пептидный фрагмент. В результате образуется укороченная форма sCD14 из 64 аминокислотных остатков, первоначально названная *субтипом sCD14 (subtype sCD14-ST)* и затем переименованная в пресепсин.

**Пресепсин (ПСП)** – это белок с молекулярной массой 13 кДа, содержащий N-терминальный фрагмент CD14 и не содержащий C-терминальный участок, ответственный за связывание с ЛПС. Неожиданно было обнаружено, что у кроликов с индуцированным сепсисом и у септических пациентов уровни ПСП резко повышены, что указывало на перспективность ПСП как маркера сепсиса [31].

### Механизм образования пресептина

Специальные эксперименты показали, что воспаление, индуцированное у кроликов с помощью препаратов ЛПС, не содержащих бактерий, не сопровождалось повышением уровня ПСП в крови, а сепсис, вызванный перевязкой и пункцией слепой кишки (cecal ligation and puncture – CLP) и инфицированием жизнеспособными бактериями, вызывал существенный рост концентрации ПСП (рис. 1).

Это привело к пониманию того, что для образования ПСП лейкоцитами одного лишь действия эндотоксина недостаточно, необходима

активация фагоцитоза. Дальнейшие исследования показали, что факторы, стимулирующие фагоцитоз, активируют и образование ПСП, а ингибирующие факторы, напротив, подавляют его образование. Таким образом, ПСП – это *гуморальный фактор, специфичный для фагоцитоза* [31, 32].

Результаты модельных опытов на животных позволяют полагать, что в образовании ПСП большую роль играют лизосомальные протеазы. Под действием провоспалительных агентов (ЛПС, интерферон-гамма – IFN $\gamma$ , формил-метионин-лейцин-фенилаланин – fMLP, форбол-12-миристат-13-ацетат – PMA), образование sCD14-ST в гранулоцитах кролика не индуцировалось, но ускорялось при прибавлении жизнеспособных клеток *Escherichia coli*. Это еще раз подтверждает, что sCD14-ST образуется в ходе фагоцитоза. Действительно, ингибиторы фагоцитоза (цитохалазин D и вортоманин) угнетали образование ПСП, а протеаза (катепсин D) способствовала образованию ПСП из CD14 *in vitro*. Полагают, что «*механизм индукции ПСП зависит от фагоцитоза, и катепсин D является одним из ферментов, фрагментирующим sCD14. Такой механизм – очевидное указание на путь образования sCD14-ST у септических пациентов*» [33, 34].

Как уже говорилось, индукция ПКТ следует за пиковым уровнем провоспалительных цитокинов [4–6]. Как оказалось (рис. 2), после перевязки и пункции слепой кишки у кроликов уровень ПСП начинает повышаться через 1,5 ч, а синтез цитокина ИЛ-6 – через

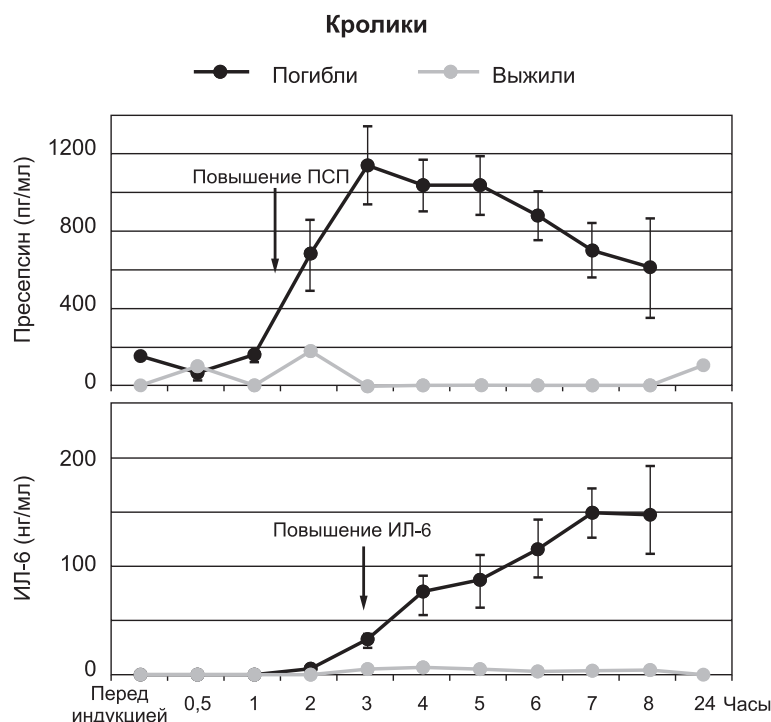


Рис. 2. Динамика уровней ПСП и ИЛ-6 после индукции сепсиса путем перевязки и пункции слепой кишки в эксперименте [33]



3 ч. Уровень ПСП достигал максимума через 3 ч, а уровень ИЛ-6 — через 7 ч [33]. Таким образом, уровни ПСП резко возрастают еще до повышения концентрации ИЛ-6, а уровни ПКТ — после пика ИЛ-6, то есть концентрация ПСП характеризует фагоцитоз, а концентрация ИЛ-6 — воспаление.

Поскольку ПСП — это гуморальный белок, выделяющийся при фагоцитозе, определение его уровня может применяться и для научных исследований, направленных, в частности, на выявление: 1) факторов, свидетельствующих об интенсивности фагоцитоза, 2) факторов, стимулирующих или ингибирующих фагоцитоз при различных патологиях, 3) действия препаратов, влияющих на фагоцитоз. Такие исследования весьма перспективны для поиска новых методов диагностики и мониторинга патологий, связанных с фагоцитозом, и, в частности, для выяснения физиологической роли ПСП, которая пока еще неизвестна [34].

Значительный прогресс в исследовании маркерных характеристик ПСП [35, 36] был достигнут после разработки быстрого и полностью автоматического метода определения уровня ПСП в цельной крови с использованием иммуно-хемилюминисцентного экспресс-анализатора PATHFAST (Mitsubishi Chemical Medience Corporation, Japan). Нижний предел определения составляет 13,4 пг/мл, линейность — до 20 000 пг/мл, продолжительность анализа — 17 мин [37]. Погрешность при определении в одном образце (intra-assay imprecision) составляет 3,4–4,8% в плазме, 2,7–7,1% в цельной крови; при определении в разных образцах и суммарная (within-run imprecision and total imprecision) — 3,6–4,4% в плазме и 5,2–6,5% в цельной крови. Интерференции с билирубином, гемоглобином, липидами, триглицеридами и ревматоидным фактором не наблюдалось.

#### Пресепсин — высокоэффективный маркер сепсиса

Наблюдалось 140 септических пациентов, поступивших в отделение неотложной терапии (ОНТ), контрольная группа включала 119 здоровых лиц. Уровень ПСП и ПКТ определяли при поступлении, через 24 и 72 ч. Для оценки тяжести сепсиса фиксировались 30-дневная летальность, необходимость интенсивной терапии, искусственной вентиляции легких (ИВЛ), диализа. Среднее значение ПСП (пг/мл) составило: в контрольной группе — 159 (148–171), у пациентов — 2563 (1458–3669). В течение 72 ч у пациентов с будущими неблагоприят-

ными исходами уровни ПСП возрастали, а у пациентов, у которых таких исходов не было, — снижались [35].

Уровень ПСП, соответствующий 99-й перцентили, не зависел от пола и возраста и составил 320 (238–335) пг/мл. Значения ROC AUC (receiver operating characteristics curve) при оценке тяжести сепсиса составляли: для ПСП — 0,71 (0,62–0,78), для ПКТ — 0,64 (0,55–0,72). Дискриминирующая способность ПСП по отношению к нетяжелому сепсису (n = 85), тяжелому сепсису или септическому шоку (n = 55) хорошо соответствовала значениям шкалы APACHE II и оказалась выше таковой для ПКТ (APACHE II — Acute Physiology And Chronic Health Evaluation — шкала оценки острых и хронических функциональных изменений). 30-дневная летальность при нетяжелом сепсисе составила 3,5%, при тяжелом — 25%, при септическом шоке — 67%. Она возрастала от 2,7% в первой квартили ПСП до 39,4% в четвертой (табл. 1).

Видно, что ПСП, как и ПКТ, может быть предиктором 30-дневной летальности, но чувствительность тестов в отношении нее разная: для ПСП она составила 0,878, для ПКТ — 0,668, для шкалы APACHE II — 0,815. Как показали авторы, «уровни ПСП связаны с тяжестью сепсиса и пригодны как для ранней диагностики сепсиса, так и для мониторинга его динамики и оценки рисков неблагоприятных исходов» [37].

В другом исследовании 2009–2010 гг. [38] наблюдался 41 пациент (возраст 62 ± 19 лет), по крайней мере, с двумя диагностическими критериями ССВО; контрольная группа состояла из 128 человек. Образцы крови брали 6 раз — при поступлении, через 12 и 24 ч и через 3, 5 и 7 дней после поступления; уровень ПСП определяли с помощью иммуноанализатора PATHFAST [39]. Диагностически значимые уровни ПСП (пг/мл) составили: в норме — 294,2 ± 121,4; при локальной инфекции — 721,0 ± 611,0; при «чистом» ССВО — 333,5 ± 130,6; при сепсисе — 817,9 ± 572,7; при тяжелом сепсисе — 1992,9 ± 1509,2.

Весьма примечательно, что при локальной инфекции уровень ПСП оказался выше, чем при ССВО. Это еще раз указывает на отсутствие реакции ПСП на воспалительные процессы, не связанные с инфекциями (СРБ и ИЛ-6, как известно, отвечают и на те, и на другие). При сравнении чувствительности и специфичности ПСП и других маркеров, применяемых для диагностики сепсиса, были получены следующие значения

Таблица 1. Риск 30-дневной летальности при сепсисе согласно квартилям ПСП и ПКТ [35]

Квартили	I (n = 37)	II (n = 35)	III (n = 35)	IV (n = 33)
ПСП, пг/мл	177–512	524–927	950–1810	1850–15 757
Летальность, %	2,7	8,6	17,1	39,4
ПКТ, пг/мл	0,10–0,38	0,39–1,73	1,76–7,0	8,1–292
Летальность, %	2,6	8,1	8,3	24,3

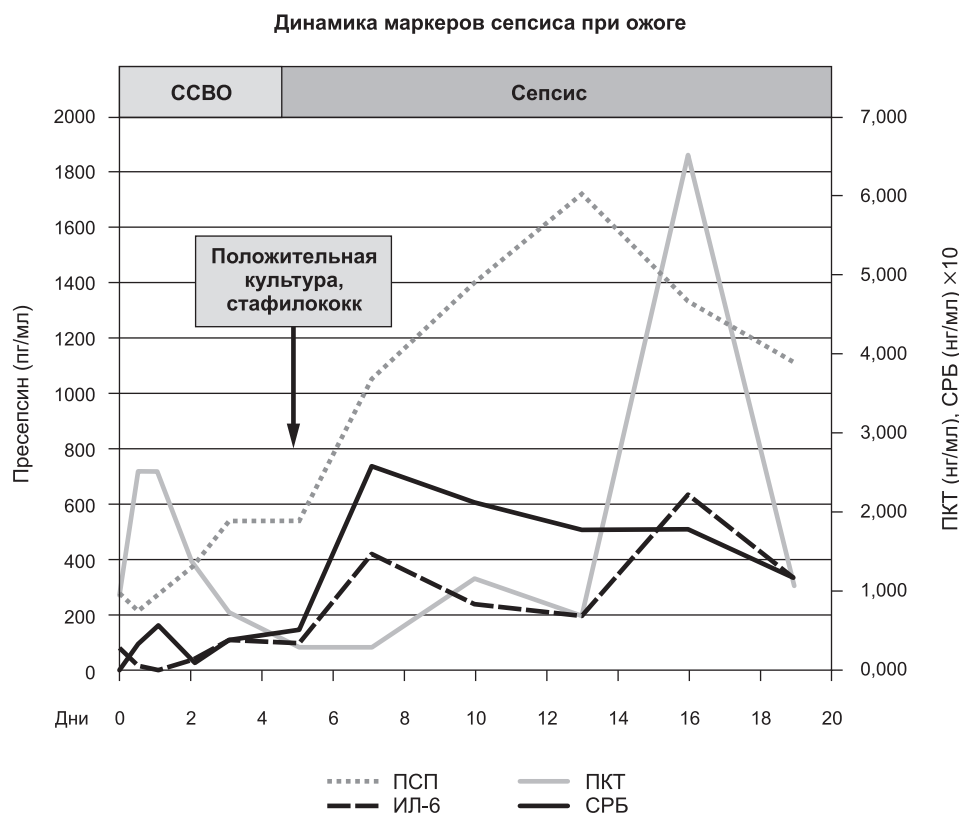


Рис. 3. Динамика уровней ПСП, ПКТ, СРБ и ИЛ-6 при ожоге [38]

AUC ROC: ПСП – 0,845, СРБ – 0,815, ИЛ-6 – 0,672, ПКТ – 0,652. Кроме того, у ПСП была самая большая корреляция со значениями показателей по шкале АРАСНЕ II [38]. В итоге при пограничном уровне ПСП 399 нг/мл, чувствительность определения составила 80,3%, специфичность – 78,5%, а при пограничном уровне 415 нг/мл – 80,1% и 81,0% соответственно [38].

Весьма интересным оказался следующий клинический случай [38]. Пациент Н., возраст 51 год, поступил с обширными ожогами (76% поверхности тела). При поступлении отмечался лейкоцитоз – 38 880/мкл, гемокультура отрицательная, уровни ПСП и ПКТ – ниже пограничных (281 нг/мл и 0,98 нг/мл соответственно). Был поставлен диагноз ССВО. На 6 день в гемокультуре обнаружен стафилококк: динамика ПСП, ПКТ, СРБ и ИЛ-6 показана на рисунке 3.

Из рисунка 3 следует, что при развитии грамположительного сепсиса ПСП начинает повышаться на 6-й день, а ПКТ – лишь на 14-й.

### Заключение

Пресепсин – это гуморальный белок, выделяемый в циркуляцию фагоцитами при фагоцитозе.

Он может служить новым высокоспецифичным и высокочувствительным маркером сепсиса, поскольку раньше и быстрее, чем другие известные маркеры, отражает его динамику.

Определение уровня ПСП весьма эффективно для ранней диагностики сепсиса, его мониторинга и прогнозирования неблагоприятных исходов.

Использование пресепсина перспективно и для научных исследований, направленных на выяснение факторов, влияющих на фагоцитоз и на поиск соответствующих препаратов.

### Благодарности

Автор сердечно благодарит д. м. н. проф. А.Ж. Гильманова (Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа) за большую помощь, оказанную при подготовке данной статьи. Автор также благодарит О.И. Резникову (ЗАО «ДИАКОН») за помощь в работе над текстом.

### Литература

1. Slade E., Tamber P.S. The Surviving Sepsis Campaign: raising awareness to reduce mortality // Crit. Care. 2003, 7 (1): 1–2.
2. Sexton P.M., Christopoulos G., Christopoulos A. et al. Procalcitonin has bioactivity at calcitonin receptor family complexes: potential mediator implications in sepsis // Crit. Care Med. 2008; 36 (5): 1637–1640.
3. Rangel-Frausto M.S., Pittet D., Costigan M. et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study // JAMA. 1995; 273 (2): 117–123.
4. Вельков В.В. Прокальцитонин и С-реактивный белок в современной лабораторной диагностике. Часть 1 // Клинико-лабораторный консилиум. Научно-практический журнал. 2008; 6 (25): 46–52.

5. Вельков В.В. Прокальцитонин и С-реактивный белок в современной лабораторной диагностике. Часть 2 // Клинико-лабораторный консилиум. Научно-практический журнал. 2009; 1 (26): 34–48.
6. Schuetz P., Albrich W., Mueller B. Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future // BMC Med. 2011; 9: 107.
7. Christ-Crain M., Müller B. Procalcitonin in bacterial infections — hype, hope, more or less? // Swiss Med Wkly. 2005; 135 (31–32): 451–460.
8. Uzzan B., Cohen R., Nicolas P., Cucherat M., Perret G.Y. Procalcitonin as a diagnostic test for sepsis in critically ill adults and after surgery or trauma: a systematic review and meta-analysis // Crit. Care Med. 2006; 34: 1996–2003.
9. Hunziker S., Hugle T., Schuchardt K. et al. The value of serum procalcitonin level for differentiation of infectious from noninfectious causes of fever after orthopaedic surgery // J. Bone Joint Surg. Am. 2010; 92: 138–148.
10. Haziot A., Chen S., Ferrero E. et al. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage // J. Immunol. 1988; 141: 547–552.
11. Antal-Szalmars P. Evaluation of CD14 in host defense // Eur. J. Clin. Invest. 2000; 30: 167–179.
12. Bas S., Gauthier B.R., Spinato U., Stingelin S., Gabay C. CD14 is an acute phase protein // J. Immunol. 2004; 172: 4470–4479.
13. Savedra R. Jr, Delude R.L., Ingalls R.R. et al. Mycobacterial lipoarabinomannan recognition requires a receptor that shares components of the endotoxin signaling system // J. Immunol. 1996; 157: 2549–2554.
14. Sellati T.J., Bouis D.A., Kitchens R.L. et al. Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytic cells via a CD14-dependent pathway distinct from that used by lipopolysaccharide // J. Immunol. 1998; 160: 5455–5464.
15. Dziarski R., Tapping R.I., Tobias P.S. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14 // J. Biol. Chem. 1998; 273: 8680–8690.
16. Klein B.S. Role of cell surface molecules of Blastomyces dermatidis in the pathogenesis and immunobiology of blastomycosis // Semin. Respir. Infect. 1997; 12: 198–205.
17. Hailman E., Lichenstein H.S., Wurfel M.M. et al. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein accelerates the binding of LPS to CD14 // J. Exp. Med. 1994; 179: 269–277.
18. Zweigner J., Schumann R.R., Weber J.R. The role of lipopolysaccharide binding protein in modulating the innate immune response // Microbes Infect. 2006; 8: 946–952.
19. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition // Int. J. Med. Microbiol. 2007; 297: 353–363.
20. Fan X., Stelter F., Menzel R. Structures in Bacillus subtilis are recognized by CD14 in a lipopolysaccharide binding protein-dependent reaction // Infect. Immun. 1999; 67 (6): 2964–2968.
21. Hasebe A., Mu H.H., Washburn L.R. Inflammatory lipoproteins purified from a toxigenic and arthritogenic strain of Mycoplasma arthritidis are dependent on Toll-like receptor 2 and CD14 // Infect. Immun. 2007; 75 (4): 1820–1826.
22. Kawai T., Akira S. TLR signaling // Semin. Immunol. 2007; 19 (1): 24–32.
23. Marchant A., Duchow J., Delville J.P. et al. Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes in human whole blood // Eur. J. Immunol. 1992; 22 (6): 1663.
24. Talwar S., Munson P.J., Barb J. et al. Gene expression profiles of peripheral blood leukocytes after endotoxin challenge in humans // Physiol. Genomics. 2006; 25: 203–215.
25. Hiki N., Berger D., Prigl C. et al. Endotoxin binding and elimination by monocytes: secretion of soluble CD14 represents an inducible mechanism counteracting reduced expression of membrane CD14 in patients with sepsis and in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria // Infect. Immun. 1998; 66: 1135–1141.
26. Grunwald U., Krüger C., Westermann J. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of solubilized CD14 in biological fluids // J. Immunol. Methods. 1992; 155 (2): 225–232.
27. Landmann R., Link S., Sansano S. et al. Soluble CD14 activates monocytic cells independently of lipopolysaccharide // Infect. Immun. 1998; 66 (5): 2264–2271.
28. Vita N., Lefort S., Sozzani P. et al. Detection and biochemical characteristics of the receptor for complexes of soluble CD14 and bacterial lipopolysaccharide // J. Immunol. 1997; 158 (7): 3457–3462.
29. Hayashi J., Masaka T., Ishikawa I. Increased levels of soluble CD14 in sera of periodontitis patients // Infect. Immun. 1999; 67 (1): 417–420.
30. Lawn S.D., Labeta M.O., Arias M., Acheampong J.W., Griffin G.E. Elevated serum concentrations of soluble CD14 in HIV- and HIV+ patients with tuberculosis in Africa: prolonged elevation during antituberculosis treatment // Clin. Exp. Immunol. 2000; 120 (3): 483–487.
31. Yaegashi Y., Shirakawa K., Sato N., Suzuki Y., Kojika M., Imai S., Takahashi G. et al. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as A marker for sepsis // J. Infect. Chemother. 2005; 11: 234–238.
32. Katsuki N. Method for Evaluation of Function of Phagocyte. United States Patent Application 20110086381, 04/14/2011
33. Shirakawa K., Naitou K., Hirose J. et al. The new sepsis marker, sCD14-ST, induction mechanism in the rabbit sepsis models // Critical Care. 2010; 14 (Suppl 2): 19.
34. Shozushima T., Takahashi G., Matsumoto N., Kojika M., Okamura Y., Endo S. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome // J. Infect. Chemother. 2011; 17 (6): 764–769.
35. Spanuth E., Wilhelm J., Lopnow H. et al. Diagnostic and Prognostic Value of Presepsin (Soluble CD14 Subtype) in Emergency Patients with Early Sepsis Using the New Assay PATHFAST Presepsin. IFCC World Lab/EuroMedLab Proceedings 2011
36. Shozushima T. Presepsin (sCD14-ST) as a new diagnostic biomarker of sepsis: development of diagnostic tools using the whole blood // Critical Care. 2011, 15 (Suppl 3): 3.
37. Okamura Y., Yokoi H. Development of a point-of-care assay system for measurement of presepsin (sCD14-ST) // Clin. Chim. Acta. 2011; 412 (23–24): 2157–2161.
38. Shozushima T., Takahashi G., Matsumoto N. et al. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome // J. Infect. Chemother. 2011; 17 (6): 764–769.
39. <http://www.pathfast.de>
40. [http://diakonlab.ru/market/hemilyuminescentnyye\\_metody/pathfast/](http://diakonlab.ru/market/hemilyuminescentnyye_metody/pathfast/)

**РЕАКТИВАЦИЯ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ  
ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК:  
ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ВОЗРАСТА И ИНТЕНСИВНОСТИ  
КОНДИЦИОНИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ**

**А.Б. ЧУХЛОВИН<sup>1</sup>, С.Н. ШИРЯЕВ<sup>2</sup>, В.Н. ВАВИЛОВ<sup>2</sup>,  
Л.С. ЗУБАРОВСКАЯ<sup>2</sup>, Б.В. АФАНАСЬЕВ<sup>2</sup>**

**ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития России**

**<sup>1</sup> Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины**

**<sup>2</sup> НИИ детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой**

**Резюме.** В настоящей работе проведена оценка возрастной и временной динамики реактивации цитомегаловируса в группе из 304 пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови, которым проводилась кондиционирующая терапия с последующей трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Определение ДНК ЦМВ в периферической крови проводилось методом качественной ПЦР до ТГСК, а также в сроки до 6 мес. после нее. В целом по группе больных от 1 до 21 года частота ЦМВ-виремии была максимальной в сроки 2–3 мес. после ТГСК. Выявлено также, что частота выявления ЦМВ была минимальной у детей младшего возраста (до 5 лет) и возрастала у старших детей (5–9 лет) после немиелоаблативного кондиционирования. Показано также, что частота ЦМВ-виремии после ТГСК зависела от ЦМВ-статуса донора, а именно трансплантация ГСК ЦМВ-положительным больным от ЦМВ-негативных доноров сопровождается ранним развитием ЦМВ-виремии (в сроки 1–2 мес. после ТГСК), по сравнению с динамикой виремии при ЦМВ-серопозитивности доноров. Таким образом, реактивация ЦМВ после алло-ТГСК зависит от целого ряда биологических факторов: 1) возраста больного; 2) режима кондиционирования, а также 3) ЦМВ-статуса реципиента и донора до алло-ТГСК.

**Ключевые слова:** гемопоэтическая трансплантация, возраст, цитомегаловирус, серологический статус.

**CYTOMEGALOVIRUS REACTIVATION AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELL  
TRANSPLANTATION DEPENDS ON PATIENTS' AGE AND CONDITIONING THERAPY**

**A.B. CHUKHLOVIN<sup>1</sup>, S.N. SHYRIAIEV<sup>2</sup>, V.N. VAVILOV<sup>2</sup>,  
L.S. ZUBAROVSKAYA<sup>2</sup>, B.V. AFANASYEV<sup>2</sup>**

**St. Petersburg State Medical I. Pavlov University**

**<sup>1</sup> Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course of Molecular Medicine**

**<sup>2</sup> Research Memorial Institute of Children Hematology and Transplantology**

**Summary.** Present study dealt with age- and time dependence of cytomegalovirus reactivation in a group of 304 patients with malignant blood diseases who underwent a conditioning therapy followed by hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). CMV DNA was determined in peripheral blood by means of qualitative PCR before transplant, and at a weekly/bi-weekly basis post-transplant, up to 6 months. In a total group under 21 years old, the frequency of CMV viremia was maximal at 2–3 months after HSCT. It was found that the frequency of CMV detection was minimal for the younger children (below 5 years old), and increased in older patients (5–9 years) after non-myeloablative conditioning treatment. It was shown that CMV frequency after HSCT depended on the donor CMV serostatus, i.e., HSCT to CMV-positive patients from CMV-negative donors is accompanied by early development of CMV viremia (within 1–2 months after HSCT), as compared to viremia course with CMV-seropositive donors. Hence, CMV reactivation after allogenic HSCT depends on a variety of biological factors, e.g., patients' age, conditioning regimen, as well as CMV serological status of donor and recipient.

**Keywords:** hematopoietic transplantation, age, cytomegalovirus, serological status.

**Данные для корреспонденции:**

Чухловин Алексей Борисович — д. м. н.,

профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины

ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздравсоцразвития РФ

Тел. +7 812 4997194, e-mail: alexei.chukh@mail.ru



## Введение

Инфекция, вызываемая цитомегаловирусом (ЦМВ) (одним из вирусов группы герпеса), как правило, имеет латентный характер и активируется в большинстве случаев при наличии тяжёлого иммунодефицитного состояния, как первичного, так и вторичного генеза [1]. Тяжёлый иммунодефицит вторичного генеза наиболее часто ассоциирован с применением цитостатических препаратов для лечения злокачественных заболеваний системы крови и иммуносупрессивных препаратов после различных видов органной и клеточной трансплантации, в значительной степени после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Внедрение в клиническую практику мониторинга ЦМВ-виремии и превентивной терапии ЦМВ-инфекции привело к снижению встречаемости ЦМВ-болезни у данной категории пациентов — с 20–30% до менее 5% в некоторых исследованиях [2]. Однако, несмотря на резкое снижение встречаемости ЦМВ-болезни и смертности, ассоциированной с манифестными формами ЦМВ-инфекции, многими авторами показано неблагоприятное влияние ЦМВ-позитивного серостатуса реципиента и донора на течение и исход алло-ТГСК [3, 4]. Сочетание ЦМВ-серонегативного реципиента и ЦМВ-серонегативного донора является оптимальным, снижающим риск развития ЦМВ-инфекции у пациентов после алло-ТГСК, в то время как ЦМВ-инфицированность реципиента и/или донора приводит к значительному ухудшению исходов алло-ТГСК, снижению общей выживаемости (ОВ), безрецидивной выживаемости (БРВ), повышению летальности, ассоциированной с трансплантацией [5, 6].

Серопозитивность по ЦМВ указывает на наличие первичной инфекции в анамнезе [7]. Временная кинетика ДНК ЦМВ в периферической крови (стандартном материале для генодиагностики) была изучена лишь в единичных работах. Так, частота детекции ДНК ЦМВ достигает максимума в 2–3 мес. после алло-ТГСК [8]. Динамика реактивации ЦМВ оценивалась лишь в небольших группах пациентов [9]. Не изучены особенности реактивации ЦМВ в зависимости от применяемого режима кондиционирования, возраста больных на момент трансплантации.

В связи с этим целью нашего исследования было изучение динамики ЦМВ-виремии после алло-ТГСК у больных различных возрастных групп, получавших различные режимы кондиционирования.

## Материалы и методы

### Характеристика больных

Под наблюдением находилось 304 пациента со злокачественными заболеваниями системы крови: острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) (n = 128), острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) (n = 92), хронический миелолейкоз (ХМЛ) (n = 27), неходжкинские лимфомы

(НХЛ) (n = 18), миелодиспластический синдром (МДС) (n = 16), получивших лечение в клинике Института детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачёвой СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова в период с 2002 по 2010 г. Возраст больных колебался от 1 до 66 лет (медиана — 17 лет). Аллогенная ТГСК (66% — от неродственных доноров, 34% — от родственных доноров) была выполнена как с миелоаблативными (МАК), так и с немиелоаблативными режимами кондиционирования (неМАК). В качестве источника трансплантата в 35% алло-ТГСК использовали костный мозг (КМ), в 65% — периферические стволовые клетки крови (ПСКК). Степень и динамику развития острой реакции «трансплантат против хозяина» (ОРТПХ), как и другие осложнения раннего периода (пневмонии, неврологические нарушения, мукозиты, циститы), регистрировали в соответствии с общепринятыми критериями.

Связь между инфекцией, связанной с реактивацией вируса простого герпеса (ВПГ-1), и стадией мукозита оценивалась с момента начала режима кондиционирования до 100 дней после трансплантации.

### Лабораторная диагностика герпесвирусных инфекций

До проведения алло-ТГСК больным, а также донорам определяли серологический статус по ЦМВ, вирусу Эпштейна–Барр (ЭБВ) и вирусу простого герпеса (ВПГ) путем определения специфических антител классов IgG, IgM, а также осуществляли ПЦР-диагностику ЦМВ-специфической ДНК в крови. После алло-ТГСК определение ЦМВ-виремии проводили в период с Д-0 до Д+30 еженедельно, и далее — 1 раз в 2–4 недели до Д+180 в пробах ДНК из периферической крови.

Образцы клеток, отмытые в растворе трис-ЭДТА, помещали в лизирующий раствор из набора «Рибосорб» «Интерлабсервис» (Москва). Из клеточного лизата выделяли нуклеиновые кислоты посредством реактивов из набора «ДНК-Сорб». Во всех вышеуказанных образцах ДНК проводилась идентификация ДНК вируса простого герпеса типов I и II, цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр с помощью стандартных коммерческих наборов фирмы «Интерлабсервис» (Москва) по инструкции производителя.

Постановку ПЦР проводили в амплификаторе «Терцик» (фирма «ДНК-Технология», Москва). Идентификацию продуктов реакций осуществляли после электрофореза в 2%-м агарозном геле с визуализацией бромистым этидием в УФ-трансллюминаторе и документацией изображений посредством цифровой фотокамеры Canon PowerShot A70.

Пробы расценивались как позитивные при наличии > 1000 генокопий в 1 мл цельной крови (порог чувствительности данной тест-системы). Критериями реактивации считалось 2 или более позитивных результата ПЦР в крови за 100 дней после алло-ТГСК, а также сред-

Таблица 1. Частота ЦМВ-положительных проб в крови у больных до алло-ТГСК

Возрастные группы, лет	Число проб	Средняя частота ЦМВ+ проб	Средняя ошибка (m)
0–4	34	2,9	2,6
5–9	80	5,0	2,5
10–14	107	8,4	2,7
15–21	149	5,4	1,9
>21	177	5,1	1,7
Общая группа	547	5,7	1,0

Примечание. Уровень достоверности различий между возрастными группами  $P > 0,05$ .

нее число ЦМВ-положительных проб за время наблюдения (до 180 дней).

При анализе результатов исследования основное внимание обращали на изменение частоты ЦМВ-положительных проб в зависимости от возраста, режима кондиционирования, восстановления лейкоцитов, а также срока наблюдения после алло-ТГСК.

### Результаты исследования

Исходные (претрансплантационные) значения частоты ЦМВ+ образцов не различались достоверно для больных разного возраста (табл. 1).

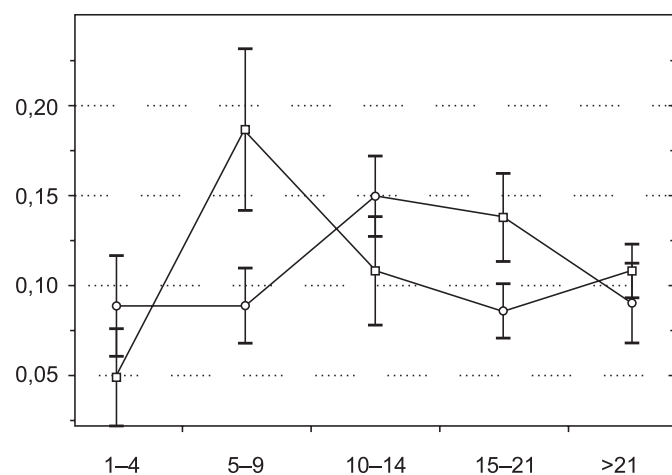


Рис. 1. Графики зависимости реактивации ЦМВ (по частоте ПЦР-положительных проб) после алло-ТГСК, в зависимости от возраста реципиента при миелоаблативном (кружки) и немиелоаблативном режимах кондиционирования (квадраты). Точки графиков представляют собой средние значения по группам ( $M \pm m$ , всего 2034 пробы). По оси абсцисс — возрастные группы (1–4, 5–9, 10–14, 15–20, 21 и старше). По оси ординат — частота ЦМВ-положительных проб ( $> 1000$  генокопий в 1 мл цельной крови)

Частота выявленной ЦМВ-виремии после алло-ТГСК была минимальна у пациентов в возрасте до 4 лет и не зависела от режима кондиционирования во всех возрастных группах за исключением детей 5–9 лет, где была существенно повышена после неМАК ( $p < 0,02$ ). Инверсия кривой при сравнении МАК и неМАК, отме-

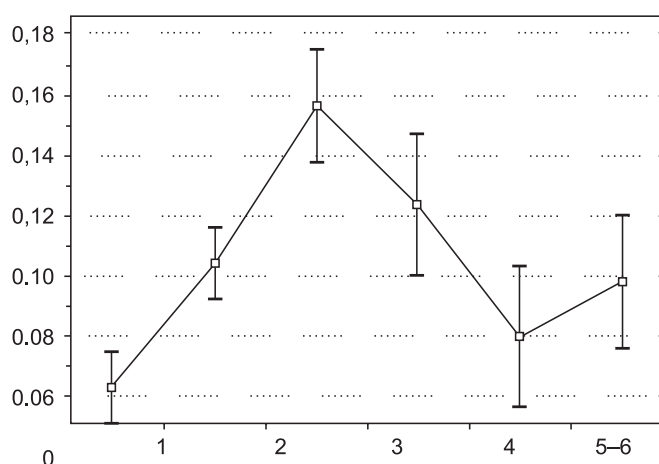


Рис. 2. Частота ЦМВ-виремии в группе больных до 21 года в различные сроки после алло-ТГСК. Точки графиков представляют собой средние значения по группам ( $M \pm m$ ). По оси абсцисс — сроки после алло-ТГСК, мес. По оси ординат — частота ЦМВ-положительных проб ( $\geq 1000$  генокопий на 1 мл цельной крови)

ченная в возрастных группах 10–14 и 15–21 лет, не имела статистически значимого различия.

Максимальный уровень реактивации ЦМВ в группе больных до 21 года наблюдали в сроки 2–3 мес. после алло-ТГСК (рис. 2). В целом не отмечалось различий между возрастными группами по срокам наиболее частого выявления ЦМВ. Кроме того, частота ЦМВ не имела достоверной корреляции со степенью аплазии кроветворения после алло-ТГСК и длительностью периода лейкопении ( $r = 0,05$ ;  $p = 0,41$ ).

При сравнении интенсивности режимов кондиционирования в группе больных до 21 года частота выявления ЦМВ после алло-ТГСК в сроки около 3 мес. имела тенденцию к повышению при миелоаблативном кондиционировании, по сравнению с немиелоаблативным ( $0,1 < p < 0,05$ ) (рис. 3). В другие периоды эти различия не имели статистически значимой достоверности ( $p > 0,1$ ).

Сравнение частоты реактивации в зависимости от ЦМВ статуса донора и реципиента до алло-ТГСК (рис. 4) выявило, что применение трансплантата ГСК от ЦМВ-

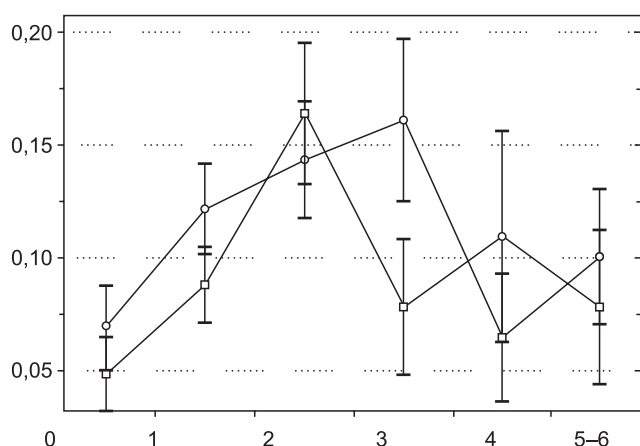


Рис. 3. Частота ЦМВ-виремии у больных до 21 года с немиелоаблативным (квадраты) и миелоаблативным (кружки) режимами кондиционирования в различные сроки после алло-ТГСК.

Точки графиков представляют собой средние значения по группам ( $M \pm m$ ). По оси абсцисс — сроки после алло-ТГСК, мес. По оси ординат — частота ЦМВ-положительных проб ( $\geq 1000$  генокопий на 1 мл цельной крови)

негативных доноров для ЦМВ-положительных реципиентов сопровождается ранним развитием ЦМВ-виремии (в сроки 1–2 мес. после ТГСК), по сравнению с динамикой виремии при ЦМВ-серопозитивности доноров ( $p = 0,04$ ).

### Обсуждение

Наши результаты получены на достаточно большой группе больных в возрастном диапазоне от 1 и до 66 лет при различной интенсивности режимов кондиционирования. Анализ суммарной кривой реактивации вируса отражает общее мнение о значительном инкубационном периоде ЦМВ-инфекции, составляющем несколько недель. При возрастной классификации нами выявлено, что ранняя активация ЦМВ (1–2 мес. после ТГСК) не отмечается у детей младшей группы (до 4 лет) и выявляется в группе 5–9 лет, чаще наблюдается после кондиционирования в немиелоаблативном режиме. Общеизвестно, что инфицирование цитомегаловирусом у большинства людей происходит в возрасте до 10 лет. Это может свидетельствовать о существенной роли активации ЦМВ из аутологичных кроветворных клеток у детей этого возраста.

Наконец, сравнение динамики реактивации ЦМВ при различной интенсивности цитостатического лечения дает возможность предположить, что частота реактивации ЦМВ достоверно выше при миелоаблативном режиме, по крайней мере — в отдельные периоды после алло-ТГСК. Этот результат не вполне согласуется с данными недавней работы Schaenman et al. [10], где показано, что немиелоаблативный режим кондиционирования при алло-ТГСК приводит к более раннему развитию

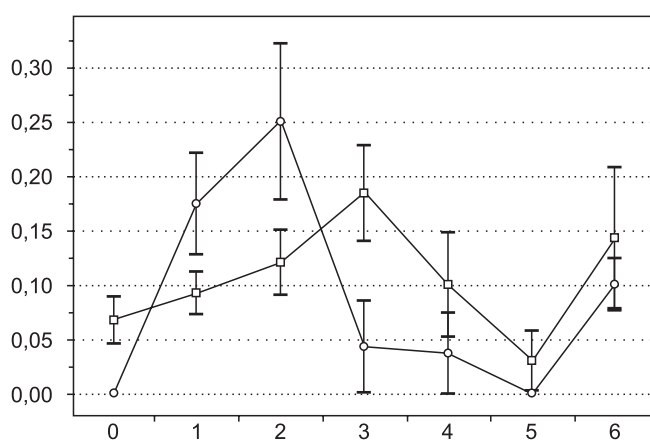


Рис. 4. Частота выявления ЦМВ-виремии после ТГСК в зависимости от ЦМВ-статуса донора (всего 914 исследований).

Отражена динамика виремии при серопозитивности реципиента и донора (квадраты), а также при серопозитивности реципиента и серонегативности донора (кружки). Точки графиков представляют собой средние значения по группам ( $M \pm m$ ). По оси абсцисс — мес. после алло-ТГСК. По оси ординат — частота ЦМВ-положительных проб ( $\geq 1000$  генокопий на 1 мл цельной крови)

виремии по сравнению с динамикой реактивации ЦМВ при миелоаблативном режиме подготовки к трансплантации. В литературе, однако, имеются данные об отложенной ЦМВ-виремии при немиелоаблативном режиме кондиционирования, включающем облучение и флударабин [11]. Похожее исследование проводилось в большой группе ЦМВ-серопозитивных больных при алло-ТГСК [12]. По их данным, в ранние сроки после алло-ТГСК частота ЦМВ-болезни не зависела от интенсивности цитостатической терапии, но в более поздние сроки немиелоаблативная терапия сопровождалась более высоким риском развития клинической ЦМВ-инфекции ( $> 100$  дней после ТГСК). Для уточнения этого вопроса следует провести дополнительные исследования в больших контингентах с применением количественной ПЦР-диагностики (определением динамики вирусной нагрузки).

Особый интерес представляет ранняя активация ЦМВ у больных с ЦМВ-серопозитивным статусом от ЦМВ-негативных доноров. Это может отражать различный уровень противовирусного клеточного иммунитета в данных группах пациентов. Поскольку восстановление кроветворения происходит за счет донорских клеток, то при серонегативном статусе можно ожидать меньших уровней специфических анти-ЦМВ Т-клеток [13], что облегчает развитие виремии.

Таким образом, реактивация ЦМВ после алло-ТГСК зависит от целого ряда биологических факторов: 1) возраста больного; 2) режима кондиционирования, а также 3) ЦМВ-статуса реципиента и донора до алло-ТГСК. Лабораторный контроль уровня реактивации ЦМВ является чрезвычайно важным анализом, необходимость

выполнения которого возникает на разных этапах проведения алло-ТГСК (до и после). Знание разнонаправленности реактивации в зависимости от возраста, режима кондиционирования позволяет выборочно проводить профилактическое применение специфических противовирусных препаратов (ганцикловир), своевременно начинать превентивное лечение, что значительно снижает риск развития ЦМВ болезни у реципиентов после алло-ТГСК.

#### Литература

1. *Ljungman P., Griffiths P., Paya C.* Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients // *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34: 1094–1097.
2. *Boeckh M.* Toward eliminating the impact of CMV/CMV seropositivity on mortality in stem cell transplant recipients: accomplishments and remaining challenges // *Blood and Marrow Transplantation Reviews.* 2004; 14: 4–6.
3. *Boeckh M.* Complications, diagnosis, management, and prevention of CMV infections: current and future. *Hematology.* 2011: 305–309.
4. *Zaia J.A.* Prevention and management of CMV-related problems after hematopoietic stem cell transplantation // *Bone Marrow Transplantation.* 2002; 29: 633–638.
5. *Kolman E., Howe C.W., Anasetti A.* et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors // *Blood.* 2001; 98: 2043–2051.
6. *Ljungman P., Brand R., Einsele H.* et al. Donor CMV serologic status and outcome // *Blood.* 2003; 102: 4255–4260.
7. *Ruell J., Barnes C., Mutton K.* et al. Active CMV disease does not always correlate with viral load detection // *Bone Marrow Transplantation.* 2007; 40: 55–61.
8. *Maeda Y., Teshima T., Yamada M.* et al. Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation // *Br. J. Haematol.* 1999; 105 (1): 295–302.
9. *Watzinger F., Suda M., Preuner S.* et al. Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients // *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (11): 5189–5198.
10. *Schaenman J.M., Shashidhar S., Rhee C.* et al. Early CMV viremia is associated with impaired viral control following nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation with a total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin preparative regimen // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2011; 17: 693–702.
11. *Junghanss C., Boeckh M., Carter R.A.* et al. Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study // *Blood.* 2002; 99 (6): 1978–1985.
12. *Nakamae H., Kirby K.A., Sandmaier B.M.* et al. Effect of conditioning regimen intensity on CMV infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2009; 15 (6): 694–703.
13. *Zhou W., Longmate J., Lacey S.F.* et al. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients // *Blood.* 2009; 113 (25): 6465–6476.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ  
**КОНСИЛИУМ**

#### ПО ВОПРОСАМ СОТРУДНИЧЕСТВА ПРОСИМ ОБРАЩАТЬСЯ:

- ПУБЛИКАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ  
в научно-практическом журнале  
«Клинико-лабораторный консилиум»

**Эмануэль Владимир Леонидович**

Тел. 8-905-229-60-22,  
e-mail: ejvcons@mail.ru

- РЕКЛАМНЫЙ ОТДЕЛ:

**Венкович Татьяна Анатольевна**  
**Морозова Ирина Александровна**

Тел./ф: (812) 600-22-74,  
e-mail: akvatest@mail.ru



## ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЗРЕЛЫХ Т- И НК-КЛЕТОЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ

**В.Н. ЦЫГАН, И.А. СУХИНА, В.Ю. НИКИТИН, А.М. ИВАНОВ, Ю.В. НИКИТИН**  
ФГБВОУ ВПО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург

**Резюме.** Проточная цитометрия является современным методом определения поверхностных и внутриклеточных маркеров. Зрелые Т-клеточные опухоли относятся к посттимическим лейкозам, так как являются негативными по TdT и антигену CD1a, характерным для ранних этапов дифференцировки Т-лимфоцитов, происходящих в тимусе. Они встречаются относительно редко и представляют собой группу нарушений с выраженной гетерогенностью клинических, морфологических и иммунологических характеристик. Иммунофенотипирование играет существенную роль в диагностике зрелых Т/НК-клеточных опухолей, потому что оно позволяет провести дифференцирование между опухолями Т-клеточного и НК-клеточного происхождения, а также классифицировать различные формы этих заболеваний. Иммунофенотипирование зрелых Т/НК-клеточных опухолей проводится в 2 этапа с помощью тройных комбинаций прямых моноклональных антител, меченных FITC, PE, PerCp или PC5. На первом этапе осуществляется первичный скрининг и определение линейной принадлежности клеток. На втором этапе типирования (классификации) уточняется вариант хронического лимфопролиферативного заболевания.

**Ключевые слова:** иммунофенотипирование, проточная цитометрия, Т-клеточный лейкоз больших гранулярных лимфоцитов, Т-клеточная лимфома, Т-клеточный рецептор (TCR).

## FLOW CYTOMETRY IN DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF MATURE T-CELL AND NK-CELL NEOPLASMS

**V.N. TSIGAN, I.A. SUKHINA, V.YU. NIKITIN, A.M. IVANOV, YU.V. NIKITIN**  
Federal State Budget Institution of Higher Professional Education  
S.M. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defence of Russian Federation, Saint-Petersburg

**Summary.** Flow cytometry is a modern technique for detection of surface membrane-bound markers and intracellular antigens. Mature T-cell neoplasms are referred to as post-thymus leukemia's, because they are negative for TdT and CD1a antigen. They are relatively rare and consist of a group of disorders with marked heterogeneity in clinical, morphologic and immunologic characteristics. Immunophenotyping plays an essential role in the diagnosis of mature T/NK-cell neoplasms because it enables the differentiation between neoplasms of T-cell origin and NK-cell origin and the subclassification of the former group. Immunophenotyping of mature T/NK-cell neoplasms is carried out in 2 stages with help the triple combinations of direct monoclonal antibodies labeling of three fluorochromes: FITC, PE, PerCP PC5. Phase 1: screening and lineage definition. Phase 2: classification.

**Key words:** immunophenotyping, flow cytometry, T-cell large granular leukemia, T-cell lymphoma, T-cell receptor (TCR).

### Данные для корреспонденции:

Сухина Ирина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,  
Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, ул. Академика Лебедева, д. 4,  
тел.: 8 (812) 292-32-96, e-mail: kinya2000@mail.ru

Последнее десятилетие принципиально изменило подход к изучению лимфоидных опухолей. Многими авторами была признана малая информативность морфологических методов исследования при ряде хронических лейкозов и склонных к лейкемизации лимфом [1, 2, 3]. Это связано с однотипной картиной абсолютно лимфоцитоза периферической крови и высокого сходства мелких или среднего размеров лимфоцитов. В настоящее время признано, что Т-клеточные лимфомы связаны с изменениями врожденного и адаптивного им-

мунитета, а изучение таких субпопуляций Т-клеток, как регуляторные Т-клетки и фолликулярные Т-клетки хелперы, способствовало новому пониманию морфологических, гистологических и иммунофенотипических особенностей Т- и НК-клеточных опухолей [4].

Определение варианта лимфопролиферативного заболевания методом проточной цитометрии основывается на установлении иммунофенотипа опухолевых клеток, находящихся в периферической крови или костном мозге. Это возможно благодаря сохранению малигнизации

рованными лимфоцитами основных дифференцировочных антигенов клетки-предшественницы, хотя встречается и aberrантная их экспрессия. Подходы к выбору панели моноклональных антител (МКА), алгоритмам иммунофенотипирования и оценке полученных результатов были предложены и обобщены сравнительно недавно [5, 6, 7, 8]. В связи с этим информативность диагностики данной группы заболеваний методом проточной цитометрии продолжает уточняться, что отражено в классификации ВОЗ 2008 [5]. В представленной статье анализируются данные литературы, посвященные изучению возможностей иммунофенотипического анализа с помощью метода проточной цитометрии для дифференциальной диагностики опухолей из зрелых Т/НК-клеток.

### Опухоли из зрелых Т- и НК-клеток

Большинство случаев хронических лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ) составляют опухоли из зрелых В-клеток (95%) [9, 10]. На долю опухолей из зрелых Т/НК-клеток приходится около 5% от всех наблюдений хронических форм ЛПЗ. В классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2008 года представлено порядка 23 нозологических форм опухолей из зрелых Т- и НК-клеток. Условно их разделяют на 4 группы: Т/НК-клеточные неоплазмы с преоб-

ладанием лейкоэмических проявлений, Т/НК-клеточные неоплазмы с преобладанием экстранодальных проявлений, Т-клеточные неоплазмы с преобладанием вовлечения в патологический процесс кожи и Т-клеточные неоплазмы с преобладанием нодальных проявлений [4]. Наиболее важную роль проточная цитометрия играет в дифференциальной диагностике Т/НК-клеточных опухолей с лейкоэмическими проявлениями, представленными следующими нозологическими формами: Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (Т-ПЛЛ), Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (Т-ЛБГЛ), хроническое лимфопролиферативное НК-клеточное заболевание (новая/временная категория по классификации ВОЗ), агрессивный НК-клеточный лейкоз, Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых (ТКЛ/ЛВ), синдром Сезари (также относится к кожным вариантам). Кроме того, проточно-цитометрический анализ необходим для диагностики гепатоспленической Т-клеточной лимфомы (относят к экстранодальным вариантам) и анапластической крупноклеточной лимфомы, как АЛК-позитивной, так и АЛК-негативной (нодальные варианты) [9, 10, 11, 12, 13, 14, 24, 25, 26]. В таблице 1 представлены иммунофенотипические характеристики некоторых из вышеперечисленных зрелых Т-клеточных опухолей. Хронические Т-клеточные опухоли относятся к посттимическим новообразованиям, так как являются негатив-

Таблица 1. Иммунофенотипическая характеристика хронических Т-клеточных лейкозов [6, 23]

Маркеры	Т-ПЛЛ	ТКЛ/ЛВ	СС	Т-ЛБГЛ
TdT	—	—	—	—
CD1	—	—	—	—
CD2	++	++	++	++
CD3	++	++	++	++
TcR-a	++	++	++	++
TcRg	—	—	—	±
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>-</sup>	+	++	++	—
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	±	—	—	±
CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>+</sup>	±	—	—	++
CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup>	—	—	—	—
CD5	++	++	++	++
CD7	++ <sup>s</sup>	±	±	++
CD16	—	—	—	±
CD56	—	—	—	±
CD57	—	—	—	++
CD25	± <sup>w</sup>	++ <sup>s</sup>	±	±
HLA-DR	—	±	±	+

Символы: —, <10% лейкозов позитивны; ±, 10–25% лейкозов позитивны; +, 25–75% лейкозов позитивны; ++, >75% лейкозов позитивны; w, слабая экспрессия антигена; s, сильная экспрессия антигена.

Сокращения: Т-ПЛЛ — Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; ТКЛ/ЛВ — Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых; СС — синдром Сезари; Т-ЛБГЛ — Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов.

ными по терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазе (ТdT) и антигену CD1a, характерным для ранних этапов дифференцировки Т-лимфоцитов, происходящих в тимусе. Они встречаются нечасто и представляют собой опухоли с выраженной гетерогенностью клинических, морфологических и иммунологических характеристик [9, 10, 11, 12, 14]. В большинстве случаев при этих лейкозах экспрессируются TCR $\alpha/\beta$  протеины, в то время как экспрессия TCR $\gamma/\delta$  встречается крайне редко, и обнаруживаются в основном при Т-ЛБГЛ.

Проведение иммунофенотипического анализа с помощью проточной цитометрии позволяет провести дифференцирование между опухолями Т-клеточного происхождения (CD3<sup>+</sup>) и НК-клеточного происхождения (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), а также классифицировать различные формы этих заболеваний [9, 10, 11, 12, 13, 14]. Периферические Т-клеточные опухоли могут быть классифицированы на TcR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> и TcR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> Т-клеточные пролиферации. Тем не менее, следует отметить, что TCR молекулы не всегда определяются при периферических Т-клеточных опухолях. Кроме этого, для иммунологической классификации должен быть принят во внимание иммунофенотип CD4/CD8, особенно если внутриклеточные гранулы содержат цитотоксические белки, которые являются типичным признаком для CD8<sup>+</sup> Т-клеточных опухолей.

НК-клеточные опухоли также позитивны для цитотоксических протеинов, однако обычно негативны по антигену CD8. Недавно обнаруженные различные натуральные человеческие цитотоксические рецепторы (NCRs) были идентифицированы как механизм запуска процесса естественной клеточно-опосредованной цитотоксичности. К ним относятся NKp46 (CD335), NKp44 (CD336) и NKp30 (CD337) белки, которые являются медиаторами процессов цитолиза аллогенных и опухолевых клеток, а также индуцируют продукцию цитокинов. Анализ экспрессии NCR-рецепторов можно применять для подтверждения НК-клеточного происхождения опухолей [15, 16]. Кроме этого, НК-клетки и цитотоксические Т-клетки в разной степени экспрессируют разнообразные ингибиторные рецепторы (killing inhibitory receptors, KIR), специфичные для молекул класса HLA-I, например, CD94, CD158a, CD158b, CD158e и CD161, которые препятствуют процессам цитотоксичности против аутологичных класса HLA-I позитивных клеток. Обнаружение монотипичной экспрессии KIRs или обнаружение отсутствия экспрессии какого-нибудь из KIR антигенов может использоваться как заместитель маркера клональности на протеиновом уровне [17, 18]. Необходимо также подчеркнуть, что аберрантное соотношение CD4/CD8 и отношение TcR $\alpha\beta$ /TcR $\gamma\delta$  не могут быть использованы для подтверждения клональности. Тем не менее, доступные в настоящее время МКА V $\beta$ , V $\gamma$  и V $\delta$  позволяют определять монотипичные TcR $\beta$  и TcR $\gamma\delta$ , что, в свою очередь, дает возможность предположить клональность новообразования [19, 20, 21, 22]. Однако фор-

мальное подтверждение клональности может быть получено только после проведения молекулярных исследований.

Злокачественные клетки при Т/НК-ЛПЗ могут быть лишены одного или более маркеров, или их экспрессия резко снижена, но эти изменения не являются специфичными для лейкозных клеток, так как встречаются в реактивных Т-клеточных популяциях.

### Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз

Т-ПЛЛ составляет приблизительно 2% от всех лейкозов из малых лимфоцитов у взрослых. Не обнаружено связи с географической распространенностью или вирусами. Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (Т-ПЛЛ) характеризуется агрессивным течением и сопровождается спленомегалией, лимфаденопатией и выраженным лейкоцитозом в периферической крови. У некоторых пациентов может протекать в индолентной форме, которая неизбежно прогрессирует [27].

Опухолевый субстрат представлен небольшими или среднего размера пролимфоцитами с безгранулярной слабо-базофильной цитоплазмой с выпячиваниями.

Показано, что, по крайней мере, в 60% случаев клетки при Т-ПЛЛ имеют фенотип CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, в 25% — CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, в 15% — CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> [14, 23]. Т-ПЛЛ можно иммунологически дифференцировать от других видов CD4<sup>+</sup> Т-клеточных лейкозов по высокой плотности антигена CD7, а также по отсутствию или слабому взаимодействию с МКА к антигену CD25 (табл. 1) [14].

На рисунке 1 приведен пример случая Т-ПЛЛ. При анализе точечных гистограмм в лимфоцитарном окне (R1) обнаружены CD3<sup>+</sup> Т-клетки с иммунофенотипом: CD2<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>/TCR $\alpha/\beta$ <sup>+</sup>/CD7<sup>S+</sup>/CD8<sup>-</sup>/CD25<sup>-</sup>CD1a<sup>-</sup> (рис. 1).

Отмечается практически полное отсутствие экспрессии В-клеточных антигенов и маркеров НК-клеток.

### Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов

Лейкозы из больших гранулярных лимфоцитов составляют отдельную гетерогенную группу хронических Т-клеточных опухолей [11, 25]. Для Т-ЛБГЛ характерна своеобразная клиническая картина болезни [13, 25].

Обновленная классификация ВОЗ 2008 дает дополнительное понимание этиологии этого редкого и гетерогенного заболевания. Т-ЛБГЛ представляет собой клональную популяцию цитотоксических эффекторных Т-клеток. Частая ассоциация с аутоиммунными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит и другие, подтверждает, что эти клоны возникают при длительной иммунной стимуляции. Олигоклональная и иногда клональная экспансия лимфоцитов Т-ЛБГЛ могут произойти после аллогенной трансплантации стволовых клеток, в ассоциации с В-клеточными опухолями и при лечении иматинибом пациентов с хроническим миелоидным лей-

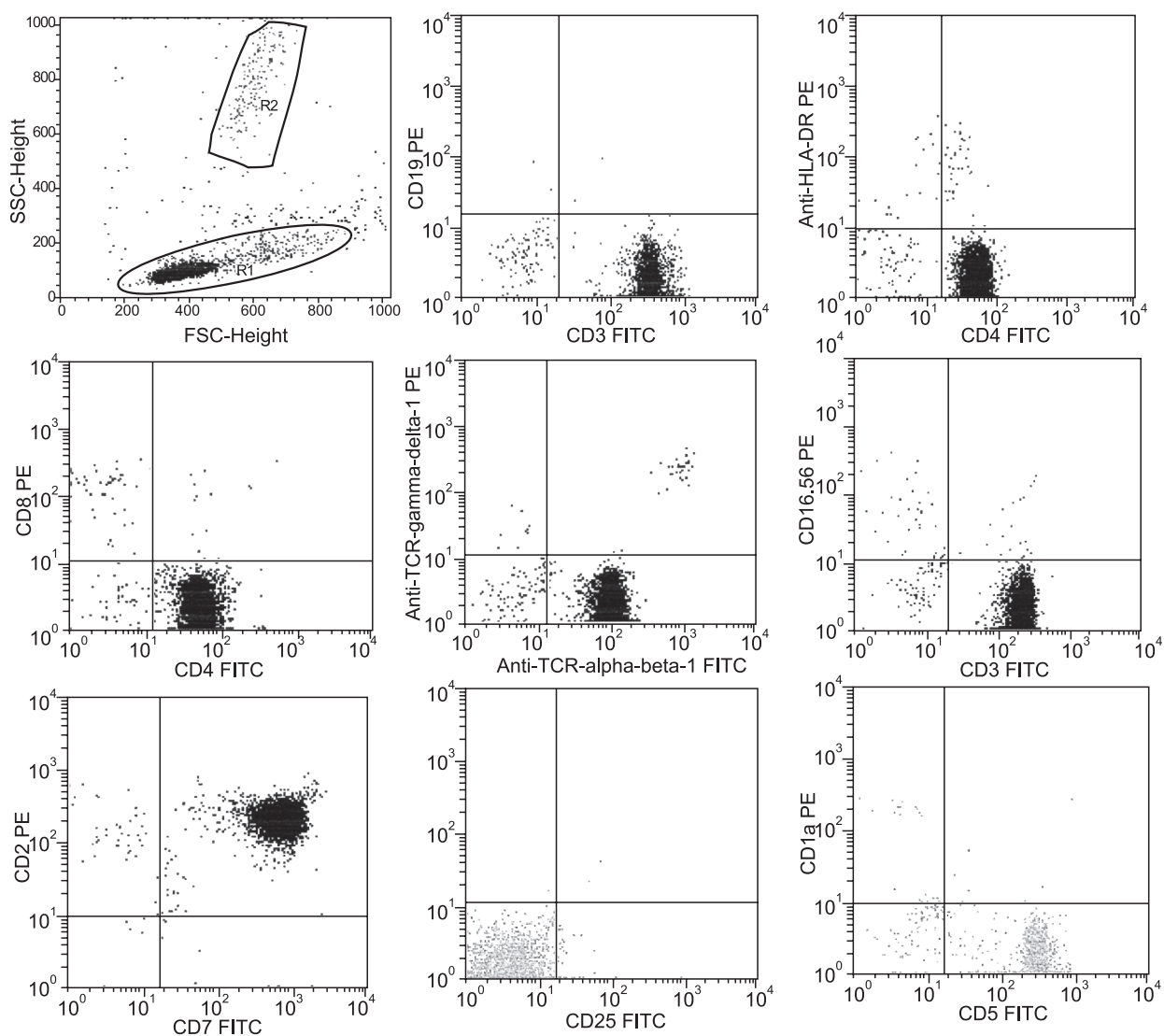


Рис. 1. Проточно-цитометрический анализ лизированных клеток цельной крови пациентки с Т-ПЛЛ. Опухолевые клетки в данном случае позитивны по следующим антигенам: CD2, CD3, CD4, CD5, TCR $\alpha/\beta$ , CD7 (ярко), негативны по антигенам CD1a, CD8 и CD25

козом. Более 50% лейкомий Т-ЛБГЛ экспрессируют CD94/NKG2 и рецепторы семейства KIR. Однородная экспрессия единственной изоформы KIR может служить как маркер клоальности [4, 27].

Большинство Т-ЛБГЛ лейкозов относятся к TCR $\alpha\beta^+$ -линейным и имеют иммунофенотип CD16 $^+$ , CD57 $^+$ , CD45RA $^+$ , CD122 $^+$ , CD25 $^-$ , в то время как позитивная экспрессия антигена CD56 наблюдается лишь у небольшого числа пациентов с Т-ЛБГЛ (табл. 1) [29]. Они являются обычно CD4 $^-$ /CD8 $^+$ , однако иногда отмечается коэкспрессия антигенов CD4 и CD8 и очень редко иммунофенотип CD4 $^+$ /CD8 $^-$  [29]. Редко встречающиеся Т-ЛБГЛ TCR $\gamma\delta^+$  (10–15%) являются преимущественно позитивными по CD2, CD3, CD5, CD7, CD8 и CD57 [30, 31, 32, 33]. Экспрессия антигенов CD16, CD56, CD11b и CD11c довольно вариабельна. В половине случаев обнаруживается V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2-иммунофенотип,

1/3 случаев является позитивной по V $\delta$ 1 и V $\gamma$ , но несколько иному, чем V $\gamma$ 9 [31].

В прошлом распознавание Т-ЛБГЛ как злокачественного новообразования было затруднено из-за кажущегося доброкачественного клинического течения и отсутствия методик доказательства клоальности. Все это способствовало появлению разных названий данного заболевания, например, Т- $\gamma$ -лимфоцитоз, хронический Т-клеточный лимфоцитоз, хроническая Т-лимфоцитарная лейкемия и лимфопролиферативное нарушение гранулярных лимфоцитов [25]. В большинстве случаев диагноз Т-ЛБГЛ может быть поставлен на основании следующих клинических и лабораторных критериев: 1. лимфоцитоз более  $2 \times 10^9$ /л или иммунофенотипическая или молекулярная очевидность экспансии отдельной ЛБГЛ популяции, персистирующей в течение 6 месяцев и более без видимой причины; 2. Морфология



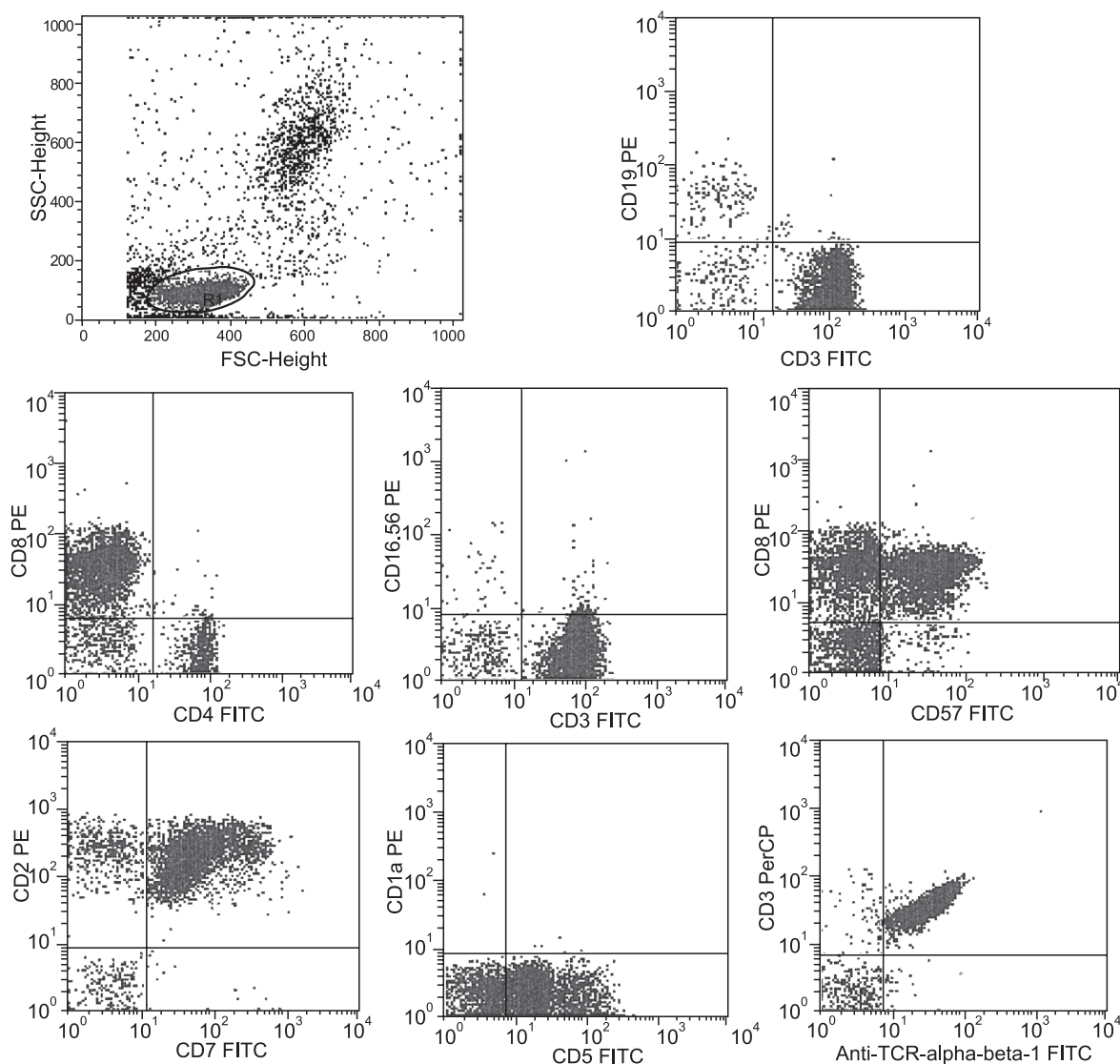


Рис. 2. Протоочно-цитометрический анализ лизированных клеток цельной крови пациента Т-ЛБГЛ.  
Опухолевые клетки в данном случае позитивны по следующим антигенам:  
CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, TCR $\alpha/\beta$ , CD57 и негативны CD16, CD56

лимфоцитов периферической крови (цитоморфология клеток при ЛБГЛ не существенна, но может использоваться как дополнительный критерий для подтверждения диагноза); 3. Нейтропения или какой-нибудь другой вид цитопении при отсутствии выраженной инфильтрации костного мозга; 4. Доминирование отдельной специфической Т-клеточной субпопуляции, выявленной путем иммунофенотипического анализа мембранных маркеров (например, CD8, CD16, CD56, CD57 и HLA-DR) [12, 25, 34]. Наряду с иммунофенотипированием необходимо проведение молекулярных исследований для подтверждения клональности на основе оценки процессов реаранжировки различных цепей Т-клеточного рецептора.

На рисунке 2 приведен пример случая Т-ЛБГЛ. Одним из наиболее полезных точечных графиков для диагностики Т-ЛБГЛ является дот-плот, демонстрирующий интенсивность экспрессии антигена CD5. В данном слу-

чае зона распределения антигена намного шире, чем уровень экспрессии CD5 на нормальных Т-лимфоцитах. Это характерный признак для большинства ЛБГЛ. При ЛБГЛ обычно можно идентифицировать вторую дискретную популяцию по слабой экспрессии антигена CD5<sup>+</sup> на БГЛ, а иногда 1/3 из них негативна по CD5 (потеря CD5 на лейкозных клетках). В данном случае на графике распределения антигена CD5 видно две группы клеток, одна из них — большая группа клеток CD<sup>dim+</sup> (со слабой экспрессией антигена), а вторая — маленькая область с нормальным распределением CD5. Кроме этого, опухолевые клетки здесь CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> и являются негативными по другим маркерам НК-клеток CD16, CD56, а также позитивны только по Т-клеточному рецептору  $\alpha\beta$  (CD3<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>). Наблюдается также вариабельная экспрессия антигенов CD2 и CD7. Это классический иммунофенотип для Т-ЛБГЛ.

### Хроническое лимфопролиферативное НК-клеточное заболевание (ХЛПЗ-НК)

Хроническое лимфопролиферативное НК-клеточное заболевание (временное название) — новая условная нозологическая форма в классификации ВОЗ 2008 г., вызванная необходимостью отличить НК-клеточные ЛПЗ от агрессивного НК-клеточного лейкоза. Объединяет различные и гетерогенные потенциальные неопластические пролиферации, ранее определявшиеся как хронический НК-клеточный лимфоцитоз, хроническое лимфопролиферативное заболевание из больших гранулярных НК-лимфоцитов и лимфоцитоз больших гранулярных НК-клеток [4]. Они редки и характеризуются персистентным (>6 месяцев) увеличением НК-клеток периферической крови (>  $2 \times 10^9$ /л) без ясно определяемой причины. Проявляется у взрослых, медиана возраста 60 лет, как у женщин, так и у мужчин. В отличие от агрессивного НК-клеточного лейкоза, нет никакой расовой предрасположенности или ассоциации с EBV. Очень трудно различить опухолевые и реактивные НК-клетки. Морфологически эти клетки идентичны с Т-ЛБГЛ, но имеют фенотип НК-клеток (CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD57<sup>-</sup>). НК-клетки негативны по поверхностному CD3, но позитивны по цитоплазматическому CD3ε. Маркеры цитотоксических Т-клеток, такие как TIA1, гранзим В и гранзим М, позитивны. Экспрессия CD2, CD7 и CD57 может быть снижена или отсутствовать, в то время как может наблюдаться aberrantная коэкспрессия CD5 и CD8. Экспрессия семейства KIR рецепторов НК-клеток или ограничена одной изоформой или полностью отсутствует. На молекулярном уровне нет никаких реаранжировок генов иммуноглобулинов и TCR. Наиболее трудно установить клональность НК-клеточных популяций, поэтому диагноз хронического лимфопролиферативного НК-клеточного заболевания требует доказательства системного заболевания, например, В-симптомы, инфильтрация костного мозга, селезенки или печени. ХЛПЗ-НК может проявляться в ассоциации с другими злокачественными и аутоиммунными заболеваниями. Клиническое течение и лечение — то же самое, что и при Т-ЛБГЛ [27].

### Агрессивный НК-клеточный лейкоз

Лейкоз из натуральных киллеров характеризуется клональной пролиферацией НК-клеток, агрессивным клиническим течением [1, 36]. Заболевание регистрируется чаще в странах Азии у лиц молодого возраста. Характеризуется лихорадкой, гепатоспленомегалией, поражением желудочно-кишечного тракта, лимфаденопатией. Агрессивный НК-клеточный лейкоз может осложняться коагулопатиями, гемофагocитарным синдромом, полиорганной недостаточностью. В патогенезе лейкоза из натуральных киллеров играет роль вирус Эпштейна–Барр. В костном мозге наблюдается массивная инфильтрация опухолевыми НК-клетками, имею-

щими морфологию БГЛ. Могут встречаться реактивные гистиоциты с явлениями гемофагocитоза. В периферической крови регистрируются анемия, лейкоцитоз с абсолютным лимфоцитозом за счет БГЛ. Обычно очень высока сывороточная ЛДГ. В костном мозге и ПК появляются недостаточно зрелые НК-клетки, часто с нуклеолой. Эти опухолевые клетки демонстрируют CD2<sup>-</sup>, sCD3<sup>-</sup>, CD3ε<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD57<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> (75%-й) фенотип с зачатком генов TCR. В классификации ВОЗ 2008 зафиксировано новое наблюдение — экспрессия Fas лиганда опухолевыми клетками и его повышенный уровень в сыворотке крови [4, 27].

В редких случаях может развиваться из экстранодальной НК/Т-клеточной лимфомы или хронических лимфопролиферативных НК-клеточных заболеваний. Хотя есть некоторые общие черты, включая присутствие EBV, агрессивный НК-клеточный лейкоз отличается от экстранодальной НК/Т-клеточной лимфомы: более молодым возрастом, высокой частотой вовлечения в патологический процесс печени, селезенки, ПК и низкой частотой вовлеченности в патологический процесс кожи, распространением болезни и быстрым фатальным исходом, несмотря на лечение.

### Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых

Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых эндемичен для Японии и стран Карибского бассейна. Он обусловлен эндемичностью человеческого Т-клеточного вируса I типа (HTLV-I) в этих регионах. У всех пациентов с ТКЛ/ЛВ наблюдается встраивание генома вируса HTLV-I в ДНК лейкозных клеток, в связи с этим для подтверждения диагноза ТКЛ/ЛВ требуется обнаружение в крови антител к HTLV-I или самого вируса. Инфекция HTLV-I затрагивает 15–20 миллионов людей во всем мире, хотя 95% из них, вероятно, остаются бессимптомными носителями, с предполагаемым пожизненным риском развития ТКЛ/ЛВ у 1–5% [27]. Классификация ВОЗ 2008 предусматривает диагностические критерии для клинических подтипов ТКЛ/ЛВ, которые коррелируют с клиническим исходом. Выделяют следующие клинические подтипы — вялотекущие (медленно прогрессирующие), хронические (умеренно прогрессирующие), острые (быстро прогрессирующие), молниеносно прогрессирующие [4]. В то время как признаны четыре клинических варианта, диагностические критерии только для первых трех из них обрисованы в общих чертах в обновленной классификации. Опухолевые лимфоциты имеют средние и большие размеры, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, причудливые ядра с расщеплениями в виде цветка и складчатостью. Для ТКЛ/ЛВ характерен иммунофенотип CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> с высокой позитивностью по антигену CD25 [10, 12]. Развивается ТКЛ/ЛВ из зараженных HTLV-I CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, что, вероятно, следствие воздействия вирусного трансактиваторного белка Tax. Опухоль происходит из регуляторных Т-клеток периферической крови

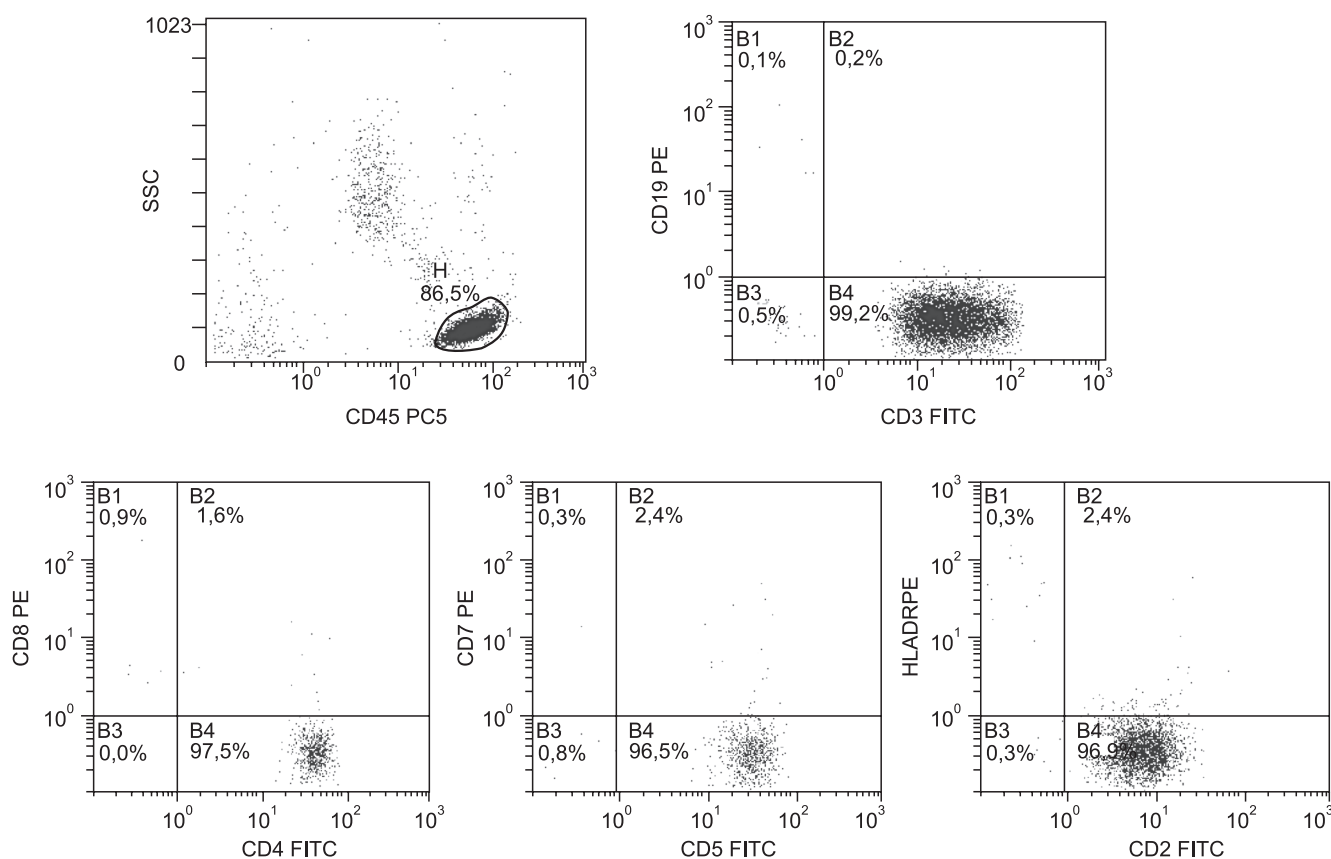


Рис. 3. Проточно-цитометрический анализ лизированных клеток цельной крови пациента с синдромом Сезари. Опухолевые клетки в данном случае позитивны по следующим антигенам: CD2, CD3, CD4, CD5, TCR $\alpha/\beta$  и негативны по CD8, CD7, CD10, CD19, CD20, CD25, HLA-DR CD16, CD56, CD57

(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>), которые экспрессируют FoxP3 и показывают интеграцию провируса HTLV-I в ДНК [4, 27].

### Синдром Сезари

Синдром Сезари представляет собой редко встречающийся лейкоемический вариант грибовидного микоза. Этот синдром характеризуется наличием эритродермии, лимфоаденопатии и диссеминацией лейкоемических клеток в периферическую кровь [10, 27]. Необходимо отметить, что малигнизированные клетки при этом заболевании имеют ядра мозговидной формы. Диагностические критерии для СС включают присутствие одного или более следующих признаков: абсолютное количество клеток Сезари минимум 1000 клеток в мм<sup>3</sup>, увеличение популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток, приводящее к соотношению CD4/CD8 больше 10 и/или потере одного или более антигенов Т-клеток. Иммунофенотип клеток Сезари лучше определен в обновленной классификации ВОЗ 2008. Лейкозные Т-клетки при ТКЛК имеют иммунофенотип CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> и негативны по антигену CD25 [28]. В дополнение к CD2, CD3, CD4 и CD5 они экспрессируют кожный лимфоцитарный антиген (CLA) и skin-homing рецептор CCR4, а CD7 и CD26 экспрессируются

в недостаточном количестве. На рисунке 3 приведен пример случая синдрома Сезари. В этом случае клетки, расположенные в лимфоцитарном окне, имеют Т-клеточный иммунофенотип: CD2<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ . На обнаруженных клетках отсутствует позитивная экспрессия основных В-клеточных антигенов (CD10, CD19, CD20), антигенов NK (CD16, CD56, CD57), антигенов CD25 и HLA-DR.

### Гепатоспленическая Т-клеточная лимфома (ГСТЛ)

ГСТЛ — редкая нозологическая форма, главным образом возникающая у юношей или молодых мужчин. Это — агрессивная болезнь с характерными клиническими проявлениями с вовлечением в процесс печени, селезенки и костного мозга. Ассоциирована с очень агрессивным клиническим течением и неблагоприятным прогнозом [35]. Вовлечение костного мозга вызывает цитопению и, чаще всего, тромбоцитопению. Медиана возраста на момент установления диагноза составляет 34 года. Диагноз устанавливается на основании вышеупомянутых особенностей наряду с типичной гистологией, показывающей синусоидальную инфильтрацию опухолевыми клетками пораженных тканей. ГСТЛ может возникнуть вследствие трансплантации солидного

органа и в других случаях иммуносупрессии. Нет никакой ассоциации с EBV. Гепатоспленическая Т-клеточная лимфома является системной  $\gamma/\delta$ -Т-клеточной пролиферацией с характерным цитотоксическим иммунофенотипом ( $CD16^+/TIA1^+$  и часто  $CD8^+/CD56^+$ ) [22, 30, 35] и имеет аномальную изохромосому 7q. Встречаются варианты с экспрессией  $\alpha/\beta$  Т-клеточного рецептора. По последним данным, на опухолевых клетках наблюдается aberrантная экспрессия множественных изоформ KIR наряду с отсутствием или слабой экспрессией CD94 [4].

### Анапластические крупноклеточные лимфомы (АККЛ)

Главное изменение, введенное в классификацию ВОЗ 2008, — разделение системной анапластической крупноклеточной лимфомы на две отдельные нозологические формы в зависимости от присутствия или отсутствия ALK генной реаранжировки и активации ALK протеина [5]. Известно, что приблизительно 60% системных АККЛ — ALK-позитивные и имеют значительно лучшую выживаемость относительно ALK-негативных случаев, оправдывая разделение этих двух категорий. В патологический процесс часто вовлекаются лимфоузлы и экстранодальные участки (50–80%). Поражение костного мозга при АККЛ наблюдается приблизительно в 25% случаев. Опухолевые клетки имеют крупные ядра различной формы, встречаются многоядерные клетки, часто на фоне реактивного полиморфно-клеточного компонента, что требует проведения дифференциальной диагностики с лимфомой Ходжкина. АККЛ отрицательны по EBV (EBER и LMP1). Во всех случаях АККЛ клетки экспрессируют CD30 [1, 36]. Более чем в 50% случаев наблюдается экспрессия эпителиального мембранного антигена (ЭМА), CD45. Характерна экспрессия активационных антигенов — CD71, CD25, HLA-DR. Экспрессия CD15 встречается редко. Более часто экспрессированы CD2 и CD4, экспрессия CD3 встречается в 25% случаев, а антигены CD5, CD7, CD8 часто отсутствуют. Нередко выявляются маркеры цитотоксических гранул (гранзим В, перфорин).

**Анапластическая крупноклеточная лимфома ALK-позитивная (АККЛ-ALK<sup>+</sup>).** ALK — рецептор тирозин киназы, экспрессия которой обычно ограничивается центральной нервной системой. Хромосомная транслокация t(2; 5) (p23; q25) приводит к образованию химерного гена нуклеофозмин-киназы анапластической лимфомы (NPM1-ALK), что определяет нозологическую форму лимфомы АККЛ-ALK<sup>+</sup>. В большинстве случаев регистрируется ядерноцитоплазматическая или цитоплазматическая экспрессия ALK-протеина. Химерный белок содержит образовавшуюся активированную ALK-киназу, приводящую к быстрой пролиферации клеток или антиапоптозическому эффекту. Были идентифицированы пятнадцать различных ALK-химерных вариантов. Экспрессируемые генные профили показали различные молекулярные сигнатуры для ALK<sup>+</sup> и ALK<sup>-</sup>

АККЛ. Этот вариант необходимо отличать от первичной кожной анапластической крупноклеточной лимфомы. Опухолевые клетки АККЛ-ALK<sup>+</sup> позитивны по большому числу эпителиальных мембранных антигенов (ЭМА), экспрессируют цитотоксические маркеры, наблюдается недостаточная экспрессия CD3 и непоследовательная экспрессия других ассоциированных с Т-клетками антигенов. Однако в 90% случаев имеются генные реаранжировки TCR. Эта нозологическая форма ассоциируется, в целом, с хорошим прогнозом, который превосходит любую другую нозологическую форму нодальных Т-клеточных лимфом [4].

**Анапластическая крупноклеточная лимфома ALK-негативная (АККЛ-ALK<sup>-</sup>).** АККЛ-ALK<sup>-</sup> введена в классификацию ВОЗ 2008 как *временная* нозологическая форма. Она определена как CD30<sup>+</sup> крупноклеточная неоплазма, которая морфологически неотличима от АККЛ-ALK-позитивной, но недостает генной реаранжировки ALK и отсутствует экспрессия химерного белка ALK. Другие иммунофенотипические особенности подобны таковым у АККЛ-ALK<sup>+</sup>, но экспрессия пан-Т-клеточных антигенов имеет тенденцию быть более частой, в то время как экспрессия цитотоксических маркеров и эпителиального мембранного антигена (ЭМА) распространена меньше. Диагностические критерии этой нозологической формы четко не определены, в частности, есть некоторое наложение с популяцией периферической Т-клеточной лимфомы неспецифицированной (ПТКЛ-NOS), также экспрессирующей CD30. Клинически у АККЛ-ALK<sup>-</sup>, прогноз намного хуже, чем у АККЛ-ALK<sup>+</sup>, но лучше, чем у ПТКЛ-NOS. В настоящее время проводимая терапия — та же самая, что и при АККЛ-ALK<sup>+</sup>, но так как результаты менее эффективны, рекомендуется, чтобы стандартное лечение применялось то же, что и при ПТКЛ-NOS [27].

### Заключение

Таким образом, проведение иммунофенотипического анализа с помощью проточной цитометрии играет существенную роль в диагностике хронических Т-клеточных лейкозов. Оно позволяет провести дифференцирование между лейкозами Т-клеточного происхождения (CD3<sup>+</sup>) и НК-клеточного происхождения (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), а также классифицировать различные формы этих заболеваний.

Имунофенотипирование, проводимое с помощью проточной цитометрии, формирует основу для современных прогностических классификационных систем хронических лейкозов. Сегодня проточная цитометрия все больше и больше применяется для первичной диагностики НХЛ. Наконец, мультипараметрическая проточная цитометрия позволяет надежно детектировать минимальную остаточную болезнь в большинстве случаев лимфоидных малигнизаций, обеспечивая, таким образом, понимание сути эффективности проводимого лечения.



Проведение иммунофенотипирования на ранних этапах обследования пациента позволяет поставить точный диагноз, что приводит к уменьшению времени пребывания пациентов в стационаре и максимально раннему назначению адекватного лечения. Тем не менее, возможность aberrантной экспрессии антигенов с дифференциальной значимостью обуславливает достаточно редкое получение неверного диагноза. В связи с этим окончательная диагностика и оценка прогноза лимфо-

пролиферативного заболевания должны базироваться на сравнении результатов иммунофенотипирования с клинической картиной, данными морфоцитохимических и молекулярно-генетических методов исследования. Кроме этого, требуется поиск дополнительных маркеров с дифференциальной значимостью и повышающих надежность диагностики комбинаций моноклональных антител.

### Литература

1. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / Под ред. М.А. Волковой. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2007: 1120.
2. Новик А.А. Классификация злокачественных лимфом. СПб.: Элби, 2000: 126.
3. Chieng J.L., Cohen J.M., Cangiarella J.F. Cytology and immunophenotyping of low- and intermediate-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas with a predominant small-cell component: A study of 56 cases // *Diagnostic Cytopathology*. 2000; 24: 90–97.
4. Lim M.S., Leval L. de, Quintanilla-Martinez L. Commentary on the 2008 WHO classification of mature T- and NK-cell neoplasms // *J. Hematop.* 2009; 2 (2): 65–73.
5. Swerdlow S.H. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th Edition. Lyon: IARC Press, 2008.
6. Ван Донген Ж., Никитин В.Ю. Проточная цитометрия в диагностике хронических лимфопролиферативных заболеваний. Диагностика и лечение лимфом: Материалы российско-голландской конф. СПб., 2002: 7–34.
7. Braylan R.C., Orfao A., Borowitz M.J. et al. Optimal number of reagents required to evaluate hematology neoplasias: Results of an international consensus meeting // *Cytometry*. 2001; 46: 23–27.
8. Catovsky D. Immunophenotypic analysis of chronic lymphoid leukemias // *Rev. Clin. Exp. Hematol.* 1997; 1: 1–14.
9. Bain B.J. Leukemia diagnosis: A guide to the FAB classification. Philadelphia: Ed. Lippincott J.B., 1990: 360.
10. General Hematology Task Force of BCSH: Immunophenotyping in the diagnosis of chronic lymphoproliferative disorders // *J. Clin. Pathol.* 1994; 47: 871–875.
11. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukemia's. French-American-British (FAB) Cooperative Group // *J. Clin. Pathol.* 1989; 42: 567–584.
12. Catovsky D., Matutes E. Leukemia's of mature T cells // *Neoplastic Hematopathology / Knowles D.M. (eds). Baltimore: Ed. Williams and Wilkins, 1992: 1267–1279.*
13. Groeneveld K., Comans-Bitter W.M., van den Beemd M.W.M. et al. Blood T-cell subsets in health and disease // *J. Int. Fed. Clin. Chem.* 1994; 6: 84–90.
14. Matutes E., Brito-Babupulle V., Swansbury J. et al. Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia // *Blood*. 1991; 78: 3269–3274.
15. Moretta A., Biassoni R., Bottino C. et al. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell mediated cytotoxicity // *Immunol. Today*. 2000; 21: 228–234.
16. Zambello R., Falco M., Della Chiesa M. et al. Expression and function of KIR and natural cytotoxicity receptors in NK-type lymphoproliferative diseases of granular lymphocytes (LDGL) // *Blood*. 2003; 102: 1787–1805.
17. Haedicke W., Ho F.C.S., Chott A. et al. Expression of CD94/ NKG2A and killer immunoglobulin-like receptors in NK cells and a subset of extranodal cytotoxic T-cell lymphomas // *Blood*. 2000; 95: 3628–3630.
18. Moretta A., Biassoni R., Bottino C. et al. Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes // *Immunol. Rev.* 1997; 155: 105–117.
19. Brinkman K., van Dongen J.J.M., van Lom K. et al. Induction of clinical remission in large granular lymphocyte leukemia with cyclosporin A, monitored by use of immunophenotyping with V beta antibodies // *Leukemia*. 1998; 12: 150–159.
20. Langerak A.W., Wolvers-Tettero I.L.M., van den Beemd M.W.M. Immunophenotypic and immunogenotypic characteristics of TCRγδ<sup>+</sup> T cell acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*. 1999; 13: 206–212.
21. van den Beemd M.W.M., Boor P.P.C., van Lochem E.G. et al. Flow cytometric analysis of the Vβ repertoire in healthy controls // *Cytometry*. 2000; 12: 647–652.
22. van Dongen J.J.M., van den Beemd M.W.M., Schellekens M. et al. Analysis of malignant T cells with the Vβ antibody panel // *Immunologist*. 1996; 4: 37–45.
23. Szczepański T., van der Velden V.H.J., van Dongen J.J.M. Classification systems for acute and chronic leukemia's // *Best Pract. Res. Clin. Hematol.* 2003; 16: 561–582.
24. Jaffe E.S., Krenacs L., Raffeld M. Classification of T-cell and NK-cell neoplasm's based on the REAL classification // *Ann. Oncol.* 1997; 8: 17–23.
25. Loughran T.P. Clonal diseases of large granular lymphocytes // *Blood*. 1993; 82: 1–14.
26. Szczepański T., van der Velden V.H.J., van Dongen J.J.M. Flow-cytometric immunophenotyping of normal and malignant lymphocytes // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006; 44: 775–796.
27. Dearden C.E., Johnson R., Pettengell R. et al. Guidelines for the management of mature T-cell and NK-cell neoplasms (excluding cutaneous T-cell lymphoma) // *British J. Haematol.* 2011; 153 (4): 451–485.
28. Willemze R., Ferl H., Sterry W. et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer // *Blood*. 1997; 90: 354–371.
29. Zambello R., Semenzato G. Large granular lymphocytosis // *Hematologica*. 1998; 83: 936–942.
30. Ahmad E., Kingma D.W., Jaffe E.S. et al. Flow cytometric immunophenotypic profiles of mature gamma delta T-cell malignancies involving peripheral blood and bone marrow // *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2005; 67: 6–12.
31. Sandberg Y., Almeida J., Gonzalez M. et al. Clonal TCRγδ + Large Granular Lymphocyte proliferations reflect the spectrum of normal TCRγδ + T-cells in peripheral blood // *Leukemia*. 2006; 20: 234–242.
32. Oshimi K. Lymphoproliferative disorders of natural killer cells // *Int. J. Hematol.* 1996; 63: 279–290.
33. Mori K.L., Egashira M., Oshimi K. Differentiation stage of natural killer cell-lineage lymphoproliferative disorders based on phenotypic analysis // *Br. J. Hematol.* 2001; 115: 225–228.
34. Semenzato G., Zambello R., Starkebaum G. et al. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis // *Blood*. 1997; 89: 256–262.
35. Cooke C.B., Krenacs L., Stetler-Stevenson M. et al. Hepatosplenic T-cell lymphoma: a distinct clinicopathologic entity of cytotoxic gamma delta T-cell origin // *Blood*. 1996; 88: 4265–4274.
36. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тулицын Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. М.; Тверь: Триада, 2005: 168.

## ТЕСТ INNOVANCE® VWF AC: ВЫСОКОСТАБИЛЬНЫЙ, ВЫСОКОТОЧНЫЙ И НАДЕЖНЫЙ

Профессор д-р Андреас Р. Губер и д-р Адриана Мендес из Центра лабораторной медицины в Кантональной больнице Аарау, Швейцария, дали положительные отзывы об использовании нового теста на активность фактора фон Виллебранда INNOVANCE VWF Ac.

**В Европе тест был доступен в начале прошлого года. В Центре лабораторной медицины Кантональной больницы Аарау новый тест INNOVANCE VWF Ac уже в начале июля 2011 г. был включен в перечень рутинных процедур.**

Также этот тест был испытан проф. Шнеппенхаймом и проф. Будде в Гамбурге. INNOVANCE VWF Ac показал отличные результаты при определении всех типов и подтипов болезни Виллебранда. Принцип теста основан на связывании фактора фон Виллебранда с альфа-цепью рецептора гликопротеина 1b (GP1b) без ристоцетина. Тест характеризуется отличной линейностью, широкими пределами измерения за счет отличных параметров стабильности реагента (рис. 1) и минимальной погрешностью. Он также является надежным диагностическим инструментом и показал высокую воспроизводимость на участвующих в исследованиях системах. Мы испытывали данный тест на анализаторах BCS® XP, Sysmex® CA-7000, CA-1500, CS-2000i и CA-560. При сопоставлении методов на различных системах была получена исключительная корреляция (рис. 2), что позволяет точно диагностировать болезнь Типа 1 среди других типов и подтипов болезни Виллебранда.



«Тест основан на связывании фактора фон Виллебранда с альфа-цепью рецептора гликопротеина 1b (GP1b) без ристоцетина, характеризуется отличной линейностью и широкими пределами измерения. Кроме того, реагенты обладают непревзойденной стабильностью».

Профессор д-р Андреас Р. Хубер

В рутинной практике мы применяем тест INNOVANCE VWF Ac при следующих показаниях:

- Предоперационный скрининг на риск кровотечений;
- Послеоперационный скрининг на риск кровотечений;
- Уточнение диагноза при геморрагическом диатезе;
- Мониторинг эффективности терапии Минирином;
- Мониторинг терапевтической заместительной терапии болезни Виллебранда.

Результаты мониторинга эффективности терапии Минирином показывают значительное увеличение фактора Виллебранда после введения десмопрессина (Minirin®), быстрое действие препарата в течение 30 минут при дозировке 0,3 мг / кг массы тела (рис. 3).

Благодаря превосходной стабильности реагенты могут храниться при (-20)–(-70)° С, что позволяет нам раз в неде-

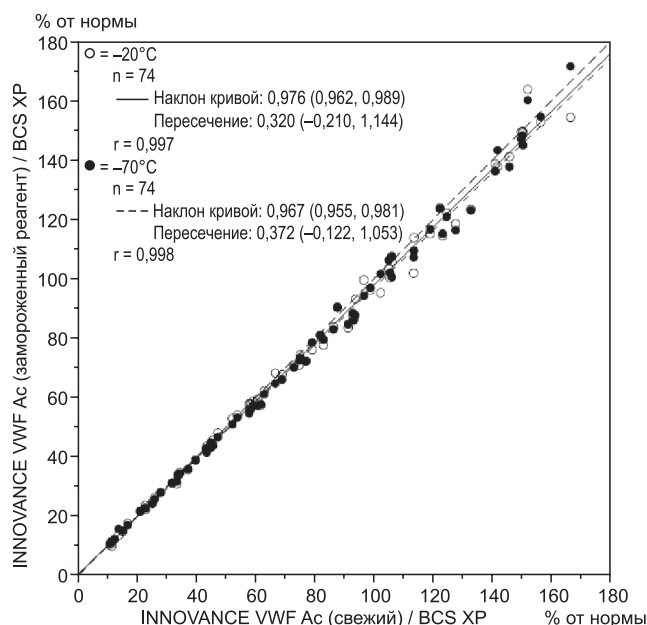


Рис. 1. Сравнение реакционных кривых при определении активности фактора фон Виллебранда при использовании свежих и замороженных реагентов

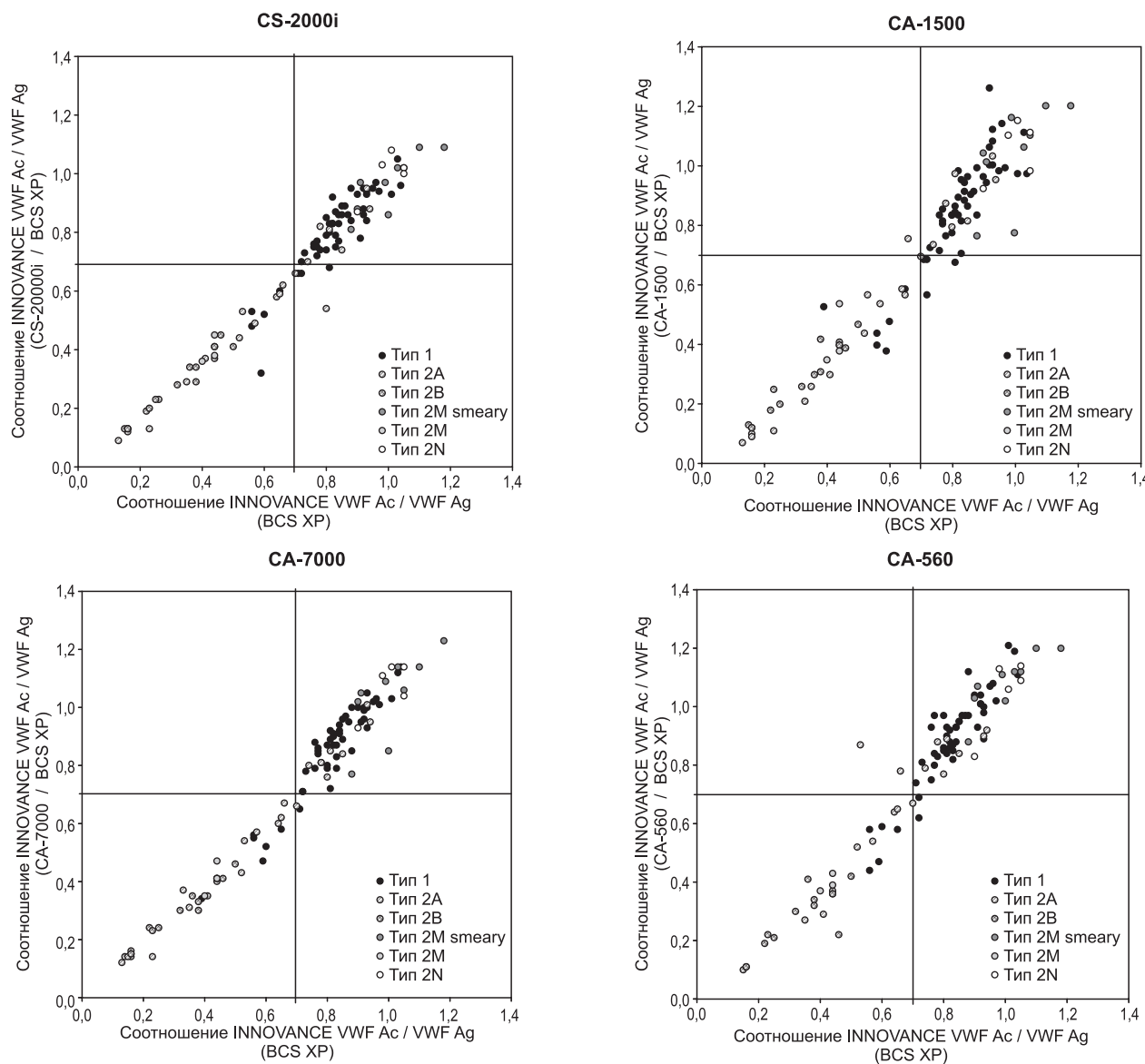


Рис. 2. Сравнение тестов INNOVANCE VWF Ac (активность) и VWF Ag (антиген) на анализаторах гемостаза BCS XP и Sysmex

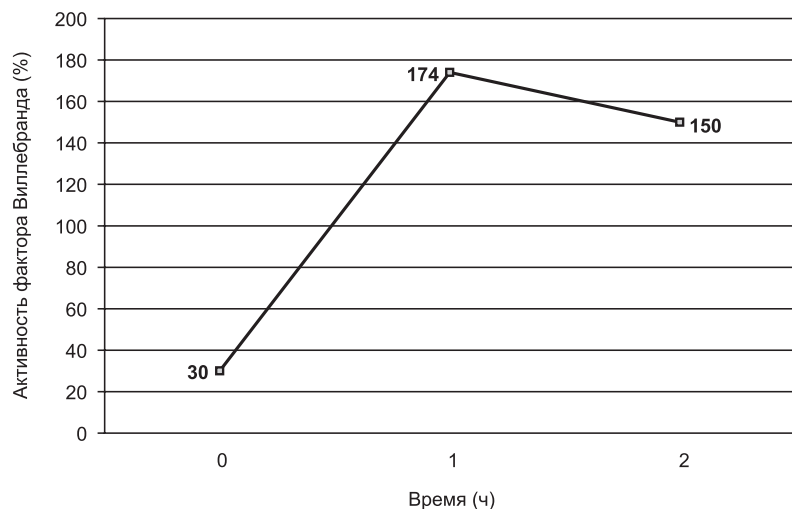


Рис. 3. Тест MiniPin® у пациентов с болезнью Виллебранда

лю применять требуемое количество реагентов в часы приема пациентов с заболеваниями, сопровождающимися нарушением свертываемости крови, что, несомненно, экономически выгодно.

Компоненты теста INNOVANCE VWF Ас просты в применении, надежны и стабильны при использовании на различных анализаторах гемостаза, что позволяет быстро получать точные результаты в случаях послеоперационных осложнений с кровотечениями, краткосрочного предоперационного геморрагического диатеза или исследований, связанных с другими рисками кровотечений.

В таких ситуациях лаборатория в кратчайшие сроки может диагностировать болезнь Виллебранда, при этом INNOVANCE VWF Ас гарантирует максимально возможный уровень надежности результатов.

Все это позволяет хирургу с большой точностью оценить риск развития кровотечений, что крайне важно для дальнейшего улучшения состояния пациента. Кроме того, существенно сокращаются расходы, связанные с необходимостью применения дорогостоящих коагуляционных препаратов.

С другой стороны, при подозрении у пациента синдрома Виллебранда–Юргенса могут быть использованы целевые факторы, что, в свою очередь, позволит сократить применение других многоцелевых препаратов (например, замороженной плазмы и др.).

На сегодняшний день в трансфузионной медицине при введении коагуляционных препаратов имеет место тенденция, суть которой можно сформулировать следующим образом: «Важно помнить, что заместительная терапия должна быть прицельной».

Это позволяет избежать не только неоправданных расходов, но и таких осложнений, как СОППЛ (синдром острого посттрансфузионного повреждения легких), инфекции и аллергические реакции. Чтобы реализовать индивидуальный подход в каждом конкретном случае при трансфузионной или замещающей терапии, лаборатории должны быть обязательно обеспечены соответствующими диагностическими тестами. И это возможно только при высокой стабильности, точности и надежности компонентов тест-систем. Наш опыт применения INNOVANCE VWF Ас от Siemens Healthcare Diagnostics показал, что этот тест в полной мере соответствует всем упомянутым выше условиям и требованиям.

**Соавторы:**

*Профессор д-р Андреас Р. Хубер, доктор Адриана Мендес*  
АО Кантональная больница Аарау, Центр лабораторной медицины  
5001 Аарау, Швейцария

*Доктор Эрих Кунцманн*  
Маркетинговый отдел подразделения гемостаза  
erich.kunzmann @ siemens.com



## КАК ВЗВЕСИТЬ ВИРУС: «НАНОВЕСЫ»?

### СТОЛЕТНИЙ ЮБИЛЕЙ ВЕСОВ ДЛЯ НАНОМЕДИЦИНЫ

Одно из первых упоминаний о микровесах относится к 1910 году, когда Уильям Рамзай сообщил о разработанном им приборе, позволявшем определять вес с точностью до 1 нанограмма. С тех пор микровесы и ультрамикровесы прочно вошли в практику современных исследовательских и медицинских лабораторий, совершенствуясь от десятилетия к десятилетию.

Актуальной проблемой в клиническом анализе в сфере атомной медицины остается необходимость обнаружения отдельных клеток и микроорганизмов. Когда говорят об измерении в нанограммовом и микрограммовом диапазоне, то имеют в виду большую группу аналитических приборов, относящихся к элитным моделям весов, точность измерения которых составляет от единиц до 0,1 нанограмма, — ультрамикро- и микровесы. Какие задачи они решают? Каковы особенности этой группы весов? Какие правила необходимо знать для корректного взвешивания?

**Какие задачи решают ультрамикро- и микровесы?** С одной стороны, повсеместное использование пестицидов и лекарственных препаратов в сельском хозяйстве приводит к накоплению последних в продуктах питания и объектах окружающей среды, что создает угрозу здоровью людей. С другой стороны, при проведении медико-биологических исследований все более активно используются различные метаболитные биомаркеры, связанные с развитием инфекционных и соматических патологических процессов, выявление которых позволяет осуществлять диагностику заболеваний на ранних стадиях. Итак, задачи, решаемые с помощью микро- и ультрамикровесов, — взятие сверхмалых навесок дорогостоящих препаратов, взвешивание фильтров для контроля запыленности воздуха, взвешивание ценных, разлагающихся и токсичных образцов, метрологические задачи — калибровка пипеток, дозаторов, шприцев. Огромную помощь эти весы оказывают при использовании их в качестве проверочного средства в рамках системы QM, благодаря таким отличительным признакам, как, например: Функция SQmin: Индикация допустимой минимальной навески в соответствии с Фармакопеей США.

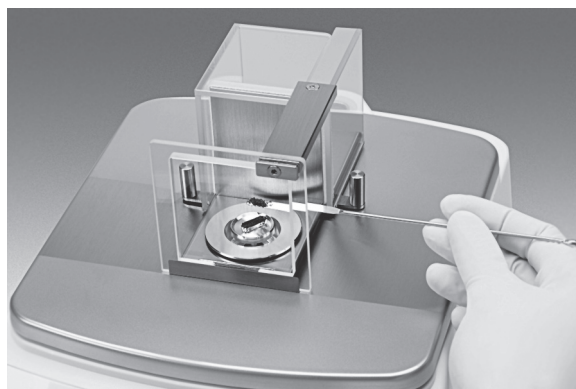
**Каковы особенности ультрамикро- и микровесов?** В системах качества GMP/GLP, ISO взвешиванию уделено значительное внимание. Например, весы требуются регулярно калибровать, точность калибровки должна периодически тестироваться внешней гирей, критические параметры необходимо защищать паролем, а их изменение следует архивировать, отчеты обязаны содержать дату, время, тип весов и имя оператора. Все это подразумевает наличие сложного программного обеспечения в сочетании с дружелюбным интуитивно понятным интерфейсом. Конструктивные и программные возможности микровесов позволяют поставить им наивысший балл по трем параметрам: Удобство, Точность, Долговечность.

**УДОБСТВО.** Все элементы эргономичной конструкции направлены на снижение утомляемости оператора, а значит,

и снижение частоты возможных ошибок. Для этой цели служат:

- Встроенное программное обеспечение с возможностью обновления через Интернет. Если точное взвешивание является частью технологического процесса и Вы хотите повысить производительность, то программа «формулирование» для быстрого и точного воспроизводства нужной рецептуры, например, решит задачу точного воспроизведения весовых композиций. Это имеет огромное значение при отработке рецептов на фармпроизводствах, при разработке новой продукции в пищевой промышленности. Микровесы контролируют соблюдение пропорций и сигнализируют в случае ошибки.
- Электронный датчик уровня, который в случае отклонения уровня от горизонтального выдает предупредительный сигнал, а на дисплей выводится подсказка оператору, как быстро вернуть весы в рабочее положение.
- Защита настроек паролями для предотвращения их случайного изменения, архивирование всех изменений настроек, создание до 8 независимых профилей работы для различных задач пользователей. На выбор четыре варианта в зависимости от личных предпочтений. Высокая воспроизводимость результатов и чрезвычайно малая погрешность взвешивания позволяют брать навески меньшей массы, снижая расход ценных, разлагающихся или токсичных веществ.

**Больше точных навесок за меньшее время.** Специальные дистанционные датчики позволяют взвешивать, не прикасаясь к весам. Открывание и закрывание дверок кожуха, тарирование выполняются автоматически, руки работают



только с образцом. Одна из специальных задач — взвешивание токсичных или радиоактивных веществ. Можно установить взвешивающую платформу под тягу или в бокс, а терминал разместить вне опасной зоны. С помощью инфракрасного датчика можно дистанционно тарировать, посылать на печать или выполнять любую запрограммированную функцию. А ваши руки полностью свободны для работы с образцом.

**Мир полон красок.** Цвет является одним из важных факторов, влияющих на восприятие. Начните работать на весах с цветным сенсорным дисплеем, и вам не захочется возвращаться в черно-белый мир. Чтобы активировать нужную функцию, просто коснитесь изображения на экране. Можно настроиться на нужную задачу, выбрав русский язык и найдя ее название в библиотеке пользователей. Цветовую гамму дисплея можно менять.

**Самый чистый первый класс.** Под чашкой традиционных аналитических весов всегда имеется отверстие для опоры чашки. Проходя через отверстие, опора передает усилие на рычаги взвешивающей ячейки. Это отверстие является слабым местом: через него порошки или растворы реактивов могут попасть внутрь механизма весов и повредить его. Часть элитных моделей лишена этого недостатка: под чашкой нет никаких отверстий. Чашка-решетка крепится к задней стенке камеры взвешивания, а под ней размещается съемный поддон. На него собираются все случайно пролитые или просыпанные реактивы. Сам поддон, решетчатая чашка, все части ветрозащитного кожуха сделаны из химически стойких материалов и могут мыться в машинах для мойки лабораторной посуды.

Ветрозащитный кожух полностью разбирается в штатном режиме. Все дверки и переднюю панель можно легко снять, вымыть и поставить на место.

**ТОЧНОСТЬ.** Известно, что даже незначительное изменение внешних условий, например, температуры, может исказить результат взвешивания.

Однако микровесы следят за внешними условиями и при необходимости выполняют калибровку и линеаризацию (настройка по трем точкам). Иногда лаборатории располагаются недалеко от источника шума и вибрации. В этом случае мощный процессор и модернизированное программное обеспечение, содержащее эффективные электронные фильтры, позволяют исключительно быстро получить точный и стабильный результат. Адаптер воспроизводимости имеет 5 различных установок и позволяет быстро адаптировать весы к внешним условиям в месте их установки, а также отрегулировать соотношение скорости/ воспроизводимости. В режиме «Быстро» вы практически моментально получаете результат.

Разделение механической и электронной «начинки» и разнесение их в пространстве обеспечивает дополнительную

защиту камеры с образцом и весовой ячейки от помех — механических, температурных и электромагнитных. В данных весах впервые решена проблема влияния потоков воздуха на точность взвешивания. Новая весовая чашка выполнена в виде решетчатой конструкции и полностью прозрачна для воздушных течений, что дает уникально короткое время стабилизации и точный результат даже в неблагоприятных условиях.

Электрический заряд на образцах снижает точность и значительно удлиняет время взвешивания. Нередко мелкодисперсные порошки реактивов приобретают заряд при пересыпании из одной емкости в другую. Элитные весы предлагают изящное решение данной проблемы — использование специального сетчатого контейнера, который экранирует электростатический заряд.

**ДОЛГОВЕЧНОСТЬ.** Микровесы должны быть готовы к реальным условиям эксплуатации. Поэтому «сердце» весов — ячейка Моноблок изготовлена из специального высокопрочного сплава алюминия, который используют для производства узлов самолета, подверженных наибольшим нагрузкам. Уникальность состоит в том, что смещение частей Моноблока в процессе взвешивания не превышает предела обратимой деформации, т. е. Моноблок может работать практически вечно. А так как ячейка подвергается лишь упругой деформации в одной плоскости и не имеет движущихся, а следовательно, изнашивающихся деталей, она устойчива к перегрузкам и случайным ударам. Благодаря компактности, отсутствию мелких деталей и винтов Моноблок прост в обслуживании и ремонте.

Защищенность внутреннего механизма весов обеспечивается отсутствием отверстия, через которое внутрь могут попасть случайно пролитые или просыпанные реактивы, как это бывает у многих лабораторных весов.

При производстве весов используются высококачественные материалы: цельнометаллический корпус, элементы кожуха, поддон, чехол на терминал устойчивы к действию большинства химических реагентов, включая кислоты. Разъемы интерфейсов и кабеля питания надежно герметизированы. Пыле- и влагозащищенная конструкция (стандарт IP 54) обеспечивает полную защиту частей механизмов, находящихся под напряжением или движущихся. Пыль никогда не проникнет в количествах, препятствующих работе весов, даже в самом запыленном помещении.

**Какие правила необходимо знать для корректного взвешивания?**

*Продолжение следует*

Генеральный директор ООО «ВЕСайленд» Ирина Павлюкова  
по материалам компании Mettler Toledo и Sartorius

## ПРИЗНАКИ КВАЛИФИКАЦИИ, ИЛИ «...СЕРВИСНОГО ИНЖЕНЕРА ВЫЗЫВАЛИ?»

«...Боксы биологической безопасности должны проверяться на защитную эффективность:

- после монтажа и подготовки к использованию;
- не реже одного раза в год при наличии фильтров предварительной очистки воздуха от крупнодисперсных частиц;
- не реже одного раза в полугодие при отсутствии фильтров предварительной очистки воздуха от крупнодисперсных частиц;
- после перемещения или ремонта бокса.

При проверке должна определяться эффективность работы фильтров очистки воздуха, скорость воздушного потока в рабочем проеме бокса...» (СП 1.3.2322-08)

Итак, обязательная проверка боксов — это данность, прописанная в нормативных документах и являющаяся руководством к действию для каждого заведующего лабораторией.

Поскольку защитные свойства, гарантирующие безопасность работы персонала, напрямую зависят от технического состояния бокса, то вопрос подбора грамотного сервисного инженера приобретает большое значение. И в самом деле, как определить, является ли приглашенный вами специалист достаточно компетентным для подобной работы? И что необходимо знать заведующему лабораторией (или лицу, ответственному за проведение проверок боксов микробиологической безопасности), чтобы избежать общения с непрофессионалами? Ответы на эти вопросы дают специалисты ЗАО «Ламинарные системы»\*.

### Состав проверок

Прежде всего, необходимо знать перечень того, что подлежит проверке в эксплуатируемых боксах. Руководствуясь ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности»\*\*, можно констатировать, что содержание перечня проверок зависит от типа испытаний — на соответствие классу, после монтажа или при техническом обслуживании боксов.

**Но независимо от типа испытаний, в каждом случае обязательно проверяются:**

- работоспособность системы управления;
- целостность фильтров;
- параметры воздушного потока;
- направление движения воздушного потока;
- работоспособность систем аварийной сигнализации.

Знание состава проверок позволит определить степень компетентности сервисного инженера. Попросите его объяснить, что именно он собирается проверить в боксах вашей лаборатории.

### Оборудование и приборы

Арсенал сервисного инженера может варьироваться, но наличие некоторых приборов является обязательным, поскольку без них просто невозможно произвести необходимые измерения. К таким приборам относятся:

- **анемометр** (для измерения скорости воздушного потока);

- **счетчик аэрозольных частиц** (для проверки целостности установленных фильтров);
- **генератор дыма** (для визуализации воздушного потока).

Убедитесь в наличии этих приборов у сервисного инженера. К слову сказать, стоимость подобного оснащения исчисляется сотнями тысяч рублей, и если у специалиста такое оборудование есть, значит, к вопросу сервисного обслуживания он подходит со всей ответственностью.

Согласно ГОСТ Р ЕН 12469-2010, «...Все оборудование, используемое для таких испытаний, должно быть сертифицировано и периодически откалибровано. Дата последней калибровки должна быть зафиксирована и легко доступна для визуализации».

Поэтому не стесняйтесь попросить сервисного инженера показать вам ежегодно выдаваемые **свидетельства о проверке** на используемые приборы и оборудование. Обратите внимание, что выдача подобных сертификатов должна осуществляться органом, получившим государственную аккредитацию на осуществление этой деятельности.

### Подтверждающие документы

По окончании работы сервисный инженер должен выдать протокол испытаний и, при необходимости, акт выполненных работ. Здесь также есть определенные требования. В частности, протокол испытаний должен содержать:

- отметку о типе проводимых испытаний (на соответствие ТУ, ГОСТ, СП и т. п.);
- наименование модели и серийного номера проверяемого оборудования;
- результаты проверок;
- результаты проведенных измерений;
- отметки о наличии свидетельства о поверке на приборы и оборудование, используемые для измерений;
- реквизиты организации, направившей специалиста.

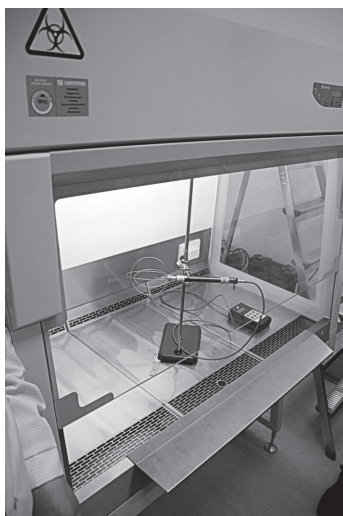
Помимо обязательных проверок, существуют и другие, необходимость которых обусловлена типом испытания. Полную информацию об испытании боксов микробиологической безопасности содержит ГОСТ Р ЕН 12469-2010.

Специалисты ЗАО «Ламинарные системы», как инициаторы разработки и внедрения этого ГОСТа, готовы ответить на любые вопросы по эксплуатации и сервисному обслуживанию боксов микробиологической безопасности. Для этого на сайте [www.lamsys.ru](http://www.lamsys.ru) создана форма обратной связи.

\* ЗАО «Ламинарные системы» — производитель лабораторного оборудования, инициатор внедрения нового национального стандарта ГОСТ Р ЕН 12469-2010, разработчик специальных методик проверки и тестирования боксов микробиологической безопасности.

В структуре предприятия есть участок приемо-сдаточных испытаний, оснащенный самыми современными приборами и оборудованием. Каждое готовое изделие проходит здесь всесторонний контроль качества в соответствии с требованиями российских и европейских стандартов. Методики проверки и тестирования постоянно совершенствуются. Инженеры предприятия регулярно обмениваются опытом с отечественными и зарубежными специалистами. На базе предприятия проводятся обучающие семинары для сервисных инженеров.

\*\* ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности» является аутентичным переводом европейского стандарта EN 12469:2000 «Biotechnology — Performance criteria for microbiological safety cabinets».



На фото (слева направо):  
измерение скорости воздушного потока анемометром  
проверка целостности HEPA фильтра счетчиком аэрозольных частиц  
визуализация движения потоков воздуха с помощью генерации дыма



ЛАМИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ  
**LAMSYSTEMS**

Россия, 456300, Челябинская обл., г. Миасс  
Тургорякское шоссе, 2/4  
Тел./факс: (3513) 544-744; 544-500; 544-755  
[sale@lamsys.ru](mailto:sale@lamsys.ru)  
[www.lamsys.ru](http://www.lamsys.ru)  
Представительство в Москве:  
Тел./факс: (925) 508-71-26, (901) 547-84-03



## Правила для авторов, направляющих материалы в редакцию научно-практического журнала «Клинико-лабораторный консилиум»

### Уважаемые авторы!

При направлении статьи в редакцию просим соблюдать следующие правила:

Статья должна сопровождаться официальным направлением от учреждения, в котором выполнена работа, иметь визу научного руководителя, заверенную печатью учреждения.

Кроме того, необходимы копии авторского свидетельства, удостоверения на рационализаторское предложение или разрешения на публикацию, если эти документы упомянуты в тексте статьи. На последней странице статьи должны быть подписи всех авторов.

### Оформление рукописи:

1. Объем оригинальной статьи, включая таблицы, рисунки и список литературы, не должен превышать 13-15 страниц. Возможна публикация работы путем разбиения на части.

2. Параметры текстового редактора MSWord: шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12 пт, межстрочный интервал — двойной, обязательно соблюдение полей (слева — 3 см, справа — 1,5, сверху и снизу — 2 см). Все страницы должны быть пронумерованы.

3. В начале первой страницы указываются: название статьи, инициалы и фамилия(и) автора(ов), название учреждения, из которого вышла работа, город, резюме — краткое содержание статьи (200–250 слов), ключевые слова (не более 12) на русском и английском языках. В случае если авторы работают в разных учреждениях, это должно быть отмечено цифрами.

4. Оригинальные статьи должны содержать следующие разделы: введение, материалы и методы, полученные результаты, список литературы. В статью также могут включаться материалы обсуждений, дискуссий по проблеме, а также благодарности.

5. В статье указываются данные автора (или одного из авторов): фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность, место работы, адрес (организации), телефон/факс, электронный адрес. Данная информация размещается в статье после названия статьи, ФИО автора(ов), данных организации, резюме и ключевых слов на русском и английском языках в разделе «Данные для корреспонденции».

6. Все сокращения, используемые в статье, должны быть расшифрованы, кроме символов химических элементов и сокращенных названий метрических единиц.

### 7. Библиографические ссылки:

- Ссылки на литературу, цитируемую в тексте статьи, даются нумерацией арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [1]) и должны соответствовать списку литературы.
- Литературные источники приводятся в конце статьи.
- Список литературы составляется в соответствии с ГОСТ РФ 7.0.5-2008 «Библиографическая ссылка» в порядке цитирования, на отдельной странице. Фамилии иностранных авторов в тексте даются в оригинальной транскрипции (в случае, когда число авторов превышает 3, используются формулировки «et al.» и «и соавт.»).
- Все источники должны быть пронумерованы, а их нумерация — строго соответствовать нумерации в тексте статьи.
- При ссылках на авторефераты диссертаций следует указывать их название.
- Ссылаться на неопубликованные работы нельзя.
- За точность библиографии несет ответственность автор.

8. Упомянутые в тексте статьи лекарственные вещества и методы их введения должны быть утверждены МЗ и СР РФ и разрешены для клинического применения.

9. Таблицы, схемы и рисунки (если они необходимы) оформляются в виде отдельного файла, обозначенного по фамилии автора и(или) названия статьи. В тексте статьи необходимо делать ссылку на каждую таблицу, схему, рисунок, на полях должны быть обозначены места их размещения по тексту (рис. 1, табл. 1 и т. д.). Таблицы, схемы, рисунки должны иметь названия. В подписях приводится объяснение значения всех кривых, букв, цифр и других условных обозначений.

10. В материалах, направленных в журнал, должна быть использована система СИ, за исключением размерности величин, традиционно измеряемых в других мерах.

*Статьи, не соответствующие указанным правилам, могут быть возвращены авторам без рассмотрения.*

*Статьи, ранее опубликованные или направленные в другой журнал, не принимаются.*

*Все представленные работы рецензируются.*

*Исправленные автором после рецензирования и перепечатанные рукописи возвращаются в редакцию не позднее одного месяца, а исправленные гранки — через одну неделю.*

*Авторский гонорар и оплата труда по рецензированию рукописей не предусмотрены.*

*Рукописи, не принятые к печати, авторам не возвращаются.*

### Материалы просим присылать по адресу:

197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8, корпус 11, редакция журнала «Клинико-лабораторный консилиум» или доставить лично по данному адресу, предварительно позвонив в редакцию по телефону:

(812) 233-97-26; +7(905) 22-960-22 (Эмануэль Юлия Владимировна).

Предпочтительнее прислать статью по электронной почте по адресу: (текст статьи оформляется в виде одного файла, названного по фамилии первого автора).

Сопроводительные документы в этом случае можно также переслать по электронной почте, предварительно отсканировав (с печатью и подписью руководителя) или отправить по факсу: (812) 233-97-26.

Чтобы убедиться, что Ваша статья получена в редакции, при отправке по электронной почте пользуйтесь параметром «уведомление» или позвоните в редакцию.

Протокол № 2 от «05» апреля 2011 г.