



**№2-3 (46) сентябрь 2013**

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:

**Чердниченко 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 № 305



# КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Революционные преобразования в области естественно-научных дисциплин, внедрение наукоемких технологий в медицину, Национальные программы модернизации здравоохранения существенно повысили эффективность и качество медицинской помощи по широкому спектру патологических состояний.

Интенсификация процессов медицинской деятельности требует все большей кооперации медицинских работников различных специальностей. По существу, медицина переходит на «бригадный» метод реализации профессиональных компетенций при оказании помощи конкретному пациенту.

В этих условиях лабораторная диагностика выходит на передовые позиции, обеспечивая клинициста объективной информацией о состоянии организма пациента, располагая для этого широким спектром биомаркеров.

Однако для получения разнообразных сведений для формирования лабораторных симптомов и синдромов специалисты лабораторной медицины используют различные аналитические технологии, выбор которых подчас определяется конкретной клинической задачей. Таким образом, только продуктивный диалог клинициста и специалиста *in vitro* диагностики может обеспечить медицинскую информативность и экономическую целесообразность применения наукоемких технологий лабораторной медицины.

В этой связи материалы, издаваемые в научно-практическом журнале «Клинико-лабораторный консилиум», успешно развивают диалог специалистов различных направлений клинической медицины с лабораторией.

Главный специалист Министерства здравоохранения  
Российской Федерации по клинической лабораторной диагностике,  
председатель Профильной комиссии МЗ РФ  
по клинической лабораторной диагностике, профессор

*Кочетов*

Кочетов А.Г.

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

- |   |   |
|---|---|
| <b>Антонова И.Н.,</b><br>д. м. н., профессор,<br>СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова                    | <b>Кишкун А.А.,</b><br>д. м. н., профессор, Заслуженный врач РФ,<br>Российская ассоциация медицинской лабораторной<br>диагностики, Москва |
| <b>Афанасьев Б.В.,</b><br>д. м. н., профессор,<br>СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова                   | <b>Ларионова В.И.,</b><br>д. м. н., профессор, в. н. с. ФГБУ «НИДОИ<br>им. Г.И. Турнера» Минздравсоцразвития России                       |
| <b>Вавилова Т.В.,</b><br>д. м. н., СЗГМУ им. И. И. Мечникова, СПб                                 | <b>Лиознов Д.А.,</b><br>д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова   |
| <b>Власов Т.Д.,</b><br>д. м. н., профессор,<br>СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова                      | <b>Матвеев С.В.,</b><br>д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  |
| <b>Жлоба А.А.,</b><br>д. м. н., профессор,<br>СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова                       | <b>Смирнов А.В.,</b><br>д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  |
| <b>Звартау Э.Э.,</b><br>д. м. н., профессор,<br>СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова                     | <b>Сухоруков В.С.,</b><br>д. м. н., профессор,<br>НИЛ общей патологии<br>НИИ педиатрии и детской хирургии РАМН (Москва)                   |
| <b>Зыбина Н.Н.,</b><br>д. б. н., профессор,<br>ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС<br>(Санкт-Петербург) | <b>Хоровская Л.А.,</b><br>д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова   |
| <b>Зуева Е.Е.,</b><br>д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова                                     | <b>Чухловин А.Б.,</b><br>д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  |
| <b>Карпищенко А.И.,</b><br>д. м. н., профессор, СПб ГУЗ МИАЦ                                      | <b>Эмануэль В.А.,</b><br>д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова   |
|   | <b>Ягмуров О.Д.,</b><br>д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова  |

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

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

## Содержание

ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО .....	1
РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ ЖУРНАЛА «КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ» .....	2
<i>Д-р Вим Хьюисман</i> ПРЕИМУЩЕСТВА ПРИМЕНЕНИЯ СТАНДАРТА ISO15189 В ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ В ЕВРОПЕ .....	4
<i>В. В. Вельков</i> ИШЕМИЧЕСКОЕ И НЕИШЕМИЧЕСКОЕ ПОВЫШЕНИЕ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ТРОПОНИНОВ: ИНТЕРПРЕТАЦИЯ, ОЦЕНКА РИСКОВ, ТЕРАПИЯ .....	20
<i>А. Е. Кратнов</i> РОЛЬ НЕЙТРОФИЛОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА .....	39
<i>А. А. Шмонин, Н. М. Лазарева, Л. Н. Стукова, Е. А. Бондарева, В. В. Ачкасова, М. А. Александрова, Ю. В. Эмануэль, В. М. Лапина, С. В. Лапин, Е. В. Мельникова</i> ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА У ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМИ СТЕНОЗАМИ СОННЫХ АРТЕРИЙ .....	45
<i>С. В. Ротанов, А. В. Резайкина, Л. Ф. Знаменская</i> ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ .....	50
<i>А. Х. Попова, С. Н. Лунева</i> МАРКЕРЫ ОБМЕНА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В ДИАГНОСТИКЕ И ОЦЕНКЕ ИНТЕНСИВНОСТИ РОСТА МИОМЫ МАТКИ .....	54
<i>Р. К. Дибиров, С. И. Кутукова, А. И. Яременко, Н. Н. Хромов-Борисов</i> ПРЕДИКТИВНОЕ ЗНАЧЕНИЕ МАРКЕРОВ КЛЕТЧНОГО ЦИКЛА ПРИ РАКЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА .....	58
<i>А. Б. Чухловин, А. И. Яременко</i> ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ТЕСТОВ ПРИ ПАТОЛОГИИ ПАРОДОНТА .....	62
<i>С. В. Герасимова, И. М. Хаертынова</i> СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ .....	69
<i>Е. Ю. Зорина, Р. В. Орлова</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ ДИССЕМИНИРОВАННОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ПРИ БЛАГОПРИЯТНОМ И НЕБЛАГОПРИЯТНОМ ТЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ .....	77
<i>Е. Ю. Зорина, Р. В. Орлова</i> ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМОВ ХИМИОТЕРАПИИ ДИССЕМИНИРОВАННОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА КОМБИНАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРЕДИКТИВНЫХ МАРКЕРОВ .....	79
<i>Е. В. Уразовская, З. И. Микашинович</i> МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДЕСТРУКЦИИ НОГТЕЙ .....	82
<i>А. Б. Чухловин</i> МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ В ПРАКТИКЕ ВРАЧЕЙ СЕМЕЙНОЙ МЕДИЦИНЫ .....	89
<i>М. В. Стогов, Т. И. Долганова, И. И. Мартель</i> ОЦЕНКА ГАЗОВОГО ОБМЕНА У ПАЦИЕНТОВ С ОТКРЫТЫМИ ПЕРЕЛОМАМИ КОСТЕЙ ГОЛЕНИ И БЕДРА В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ ИХ ПО МЕТОДУ ИЛИЗАРОВА .....	99
<i>С. Н. Лунева, Т. И. Долганова, Н. М. Ключин</i> МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ГОМЕОСТАЗА У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ КОСТЕЙ ГОЛЕНИ .....	104
<i>Т. В. Зубкова, Н. К. Фрунцевич, А. А. Валигура</i> РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ, СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП .....	108
<i>Н. К. Фрунцевич, Т. В. Зубкова</i> ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА У ЖЕНЩИН УКРАИНЫ .....	111
ИНФОРМАЦИЯ .....	114
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ, НАПРАВЛЯЮЩИХ МАТЕРИАЛЫ В РЕДАКЦИЮ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОГО ЖУРНАЛА «КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ» .....	120

## **Преимущества применения стандарта ISO15189 в лабораторной практике в Европе**

Д-р Вим Хьюисман  
Россия, Санкт-Петербург  
30 сентября 2013

## **Параметры, необходимые для медицинской лаборатории**

- Медицинская лаборатория предоставляет информацию о диагнозе, предупреждении и лечении заболеваний
- Она не только предоставляет достоверные данные, но также выступает в роли консультативной службы
- Вмещает в себя все аспекты, включая сбор образцов и их дальнейшее исследование

## **Медицинская лаборатория... Какой сервис она предлагает?**

- 3.9
- **Медицинская лаборатория**
- **Клиническая лаборатория**
- Лаборатория для биологических, микробиологических, иммунологических, химических, иммуногематологических, гематологических, биофизических, цитологических, патологических и иных исследований, необходимых для предоставления информации для постановки диагноза, предупреждения и лечения заболеваний либо оценки состояния здоровья у людей, которая может предоставлять консультативную помощь любого плана для проведения лабораторных исследований, включая интерпретацию результатов, а также дачу советов по дальнейшему проведению адекватных исследований.
- ISO 15189:2007

## **Аспекты, необходимые для медицинской лаборатории**

- Аспекты до проведения исследования (преаналитические)
  - Советы о проведении необходимых анализов
  - Рекомендации по сбору образцов
  - Транспортировка
- Аспекты самого исследования (аналитические)
  - Внутренняя и внешняя оценка качества
  - Прослеживаемость результатов
- Аспекты после выполнения исследования (постаналитические)
  - Короткое время обработки заказа
  - Указание адекватного диапазона референсных значений
  - Советы о значении результатов

## Аспекты, необходимые для медицинской лаборатории

- Специфические требования к персоналу  
— Например, специалисты по клинической биохимии, имеющие соответствующие дипломы и сертификаты
- Специфические требования к результатам (на высоком профессиональном уровне)  
— Например, связь с международными стандартами  
— См. Объединенный комитет по прослеживаемости лабораторной медицины
- ISO 17025-2005 и ISO 9001-2008
- Общие требования к компетентности тестирующих и испытательных и калибровочных лабораторий, а также Требования к системе менеджмента качества

## Для медицинской лаборатории необходимо:

### ISO 15189 -2012 Медицинские лаборатории – частные требования по качеству и компетентности

Настоящее третье издание содержит ряд изменений по сравнению с первым изданием 2003 г. и вторым изданием 2007 г. (в сущности эти издания одинаковы)

Международный  
стандарт

ISO  
15189

1-е издание,  
15 февраля 2003 г.

Лаборатории медицинские.  
Частные требования  
к качеству и компетентности

- Написан профессионалами медицинских лабораторий
- Ответственность ISO/TC212 WG1
- Требования к качеству и компетентности
- Происходит из двух Стандартов ISO ...ISO 9001 и ISO 17025

## ISO/ TC212 и ISO15189

ISO/TC 212 — Клинико-лабораторные исследования и in vitro диагностические системы – установлены Институтом клинических и лабораторных стандартов (1995)

- ISO15189:2003 (1-е издание)
- ISO15189:2007 (2-е издание) (незначительные изменения)
- ISO 15189:2012 (3-е издание)

(отвечает за многие другие стандарты по проведению клинико-лабораторных исследований, например, исследование по месту лечения)



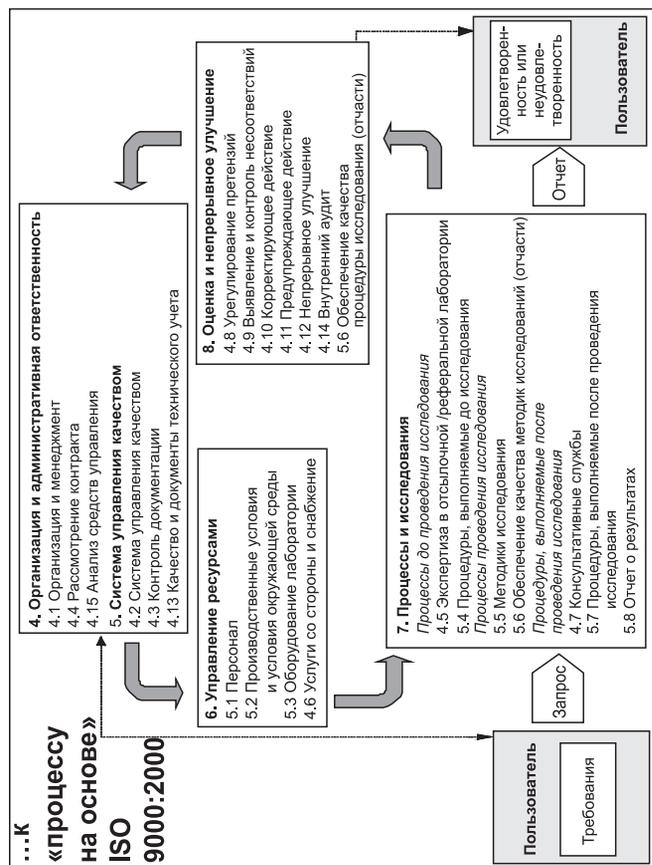
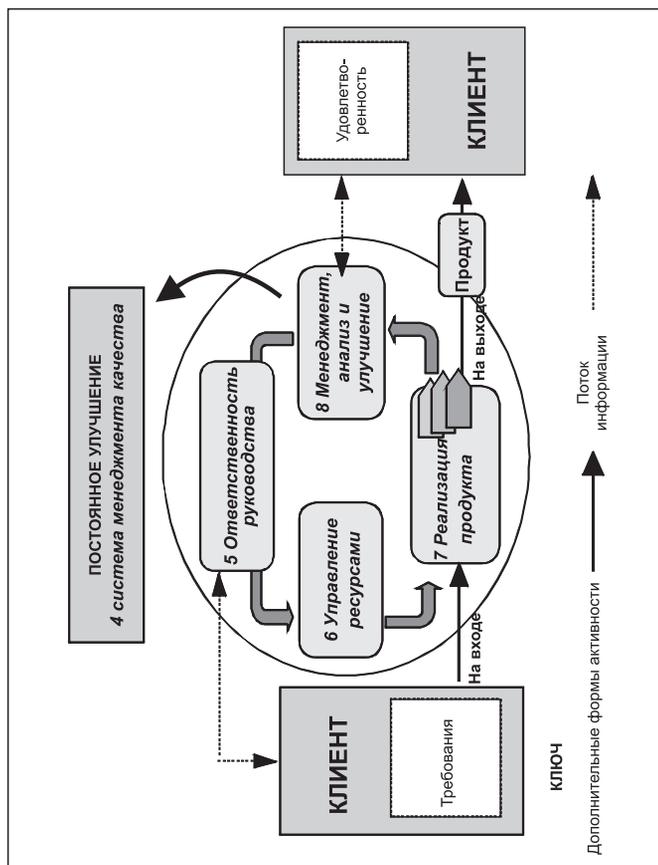
Reference number  
ISO 15189:2003(E)

## Цели пересмотренного издания

- Улучшение доступа для пользователей за счет ясности структуры и содержания
- Устранить необходимость в рекомендациях
- Изъять излишние предписания
- Доступность к проведению ясных проверок инспекторами

## Предложения для пересмотренного издания

- Вариант 1: содержание «Стандарта»
  - Содержание
  - Названия параграфов
- Вариант 2: структура «Стандарта»
  - Содержание
  - Названия параграфов
  - Основная перестройка процесса и результатов модели
- Предлагаемые изменения, представленные далее, в итоге не были разрешены



### Содержание «Стандарта»

- Недостаточно точное применение терминов
  - Лабораторный менеджмент или лаборатория
  - Политика, процессы и процедуры
  - Неопределенность измерения, неопределенность результатов
  - Прослеживаемость измерения или пробы
- Излишние предписания
  - Будет включено «руководство по сбору первичного материала»
- Параграфы без заглавия
  - Гарантировать качество результатов исследования
  - Процессы исследования – валидация и верификация

### От ISO 15189:2007 — неозаглавленные пункты... «5.5 Порядок проведения исследования»

#### 5.5 Examination procedures

NOTE Some of the following might not be applicable to all disciplines in the scope of laboratory medicine.

5.5.1 The laboratory shall use examination procedures, including those for selecting/taking sample portions, which meet the needs of the users of laboratory services and are appropriate for the examinations. Preferred procedures (journals, or appropriately)

... от Содержания в виде семи  
неозаглавленных подпунктов...

5.5.2 The suitable for t given application or field of application. The laboratory shall record the results obtained and the procedure used for the validation.

The methods and procedures selected for use shall be evaluated and found to give satisfactory results before being used for medical examinations. A review of procedures by the laboratory director or designated person shall be undertaken initially and at defined intervals. Such a review is normally carried out annually. These reviews shall be documented.

5.5.3 All procedures shall be documented and be available at the workstation for relevant staff. Documented procedures and necessary instructions shall be available in a language commonly understood by the staff in the laboratory.

Card files or similar systems that summarize key information are acceptable for use as a quick reference at the workbench, provided that a complete manual is available for reference. The card file or similar systems shall correspond to the complete manual. Any such abridged procedures shall be part of the document control system.

### ...к ISO 15189 (3-е издание) «5.5 Процессы исследования»

... к Содержанию с озаглавленными пунктами...

- 5.5.1 Выбор, валидация и верификация процедуры исследования
  - 5.5.1.1 Валидация процедур исследования
  - 5.5.1.2 Верификация процедур исследования
  - 5.5.1.3 Неопределенность результатов
- 5.5.2 Биологический референтный интервал
- 5.5.3 Документация по проведению процедур исследования

### Некоторые уточнения

#### Валидация и верификация

- Валидация предназначена для «впервые разработанных тестов», модифицированных тестов либо тестов, применяемых для других вариантов проб; должна проводиться достаточно подробно; требуется для чернового варианта Регламента по in vitro диагностике
- Верификация предназначена для наборов производителя (с маркировкой Европейского Союза); достаточно показать, что наборы работают так, как заявлено производителем набора
- **В любом случае, спецификации набора должны соответствовать предполагаемой цели**

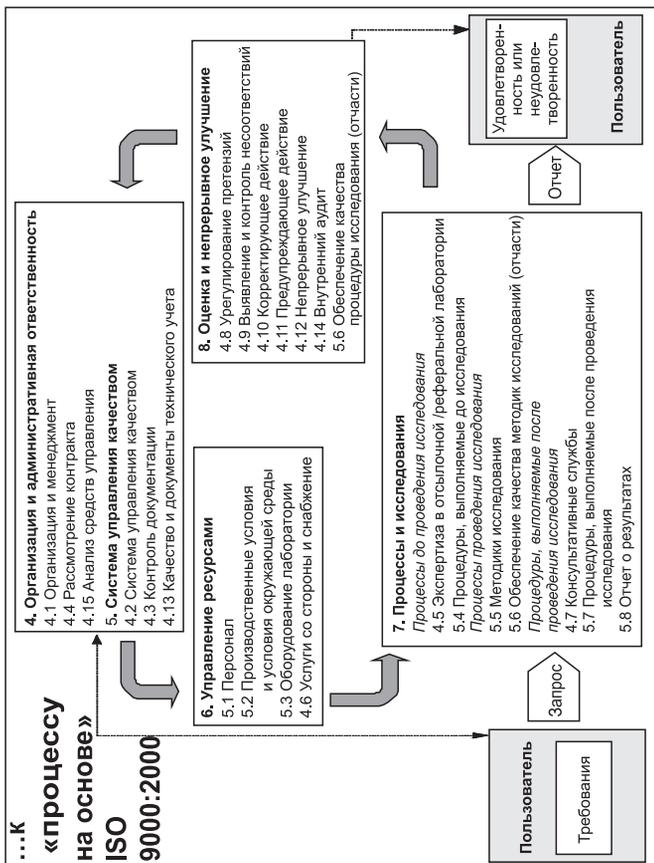
## Изъятие приложений

Удалены приложения по этике, а также приложение по технологии связи и передачи информации

- Приложение является лишь рекомендацией, не требованием, в виде примечания в Стандарте
- Теперь существенные элементы стали частью Стандарта

## Неоговоренные требования, имеющие отношение к цели

- Лаборатория должна отобрать процедуры исследования, которые были валидированы/ утверждены для их **предполагаемого** использования
- Оговоренные требования (характеристики работы оборудования) для каждой процедуры исследования должны быть соотнесены с **предполагаемым** использованием исследования
- Лаборатория должна разработать процедуры контроля качества, которые подтвердят достижение **предполагаемого** качества результатов



## Использование возможностей

### 6. Управление ресурсами

- 5.1 персонал
- 5.2 производственные условия и условия окружающей среды
- 5.3 оборудование лаборатории
- 4.6 услуги со стороны и снабжение

## 5.1 Персонал

- Требуются схема организации, должности, квалификация
- Документы, подтверждающие квалификацию и компетентность
  - Какие потребуются данные?
- Руководитель лаборатории
  - Какова его ответственность
  - Какая требуется компетентность
- Оптимальный размер штата
- Непрерывное образование
  - Как можно это продемонстрировать

## 5.1 Персонал

- 5.1.1 план организации, политика, должности
- 5.1.2 документы о необходимом образовании, профессиональной квалификации, подготовке, опыте и компетентности всего персонала
- 5.1.3 компетентность руководителя лаборатории
- 5.1.4 памятка о формах ответственности руководителя лаборатории (3-е издание, пункт 4.1.1.4)
- 5.1.5 оптимальный размер персонала (3-е издание, глава “менеджмент качества”, пункт 4.1.2.7)
- 5.1.9 непрерывное образование для персонала всех уровней. Обязательное документирование

## 5.2 Производственные условия и условия окружающей среды

- Пространство, оптимальное для качества работы, безопасности персонала и ухода за пациентом (где необходимо)
- Сбор первичных проб
  - Указать типы проб
- Качество работы
  - Указать виды работ
- Безопасность персонала
  - Указать пункты
- Складские помещения

## 5.2 Производственные условия и условия окружающей среды

- 5.2.1 адекватный размер лаборатории
- 5.2.2 эффективные и безопасные помещения
- 5.2.3 адекватный сбор первичных образцов (возможность для посещения пациентами-инвалидами)
- 5.2.4 размер лаборатории может гарантировать качество работы
- 5.2.5 контроль, мониторинг и документирование условий окружающей среды (стерильность, запыление, радиация, влажность, снабжение электроэнергией, температура и шум).  
В зависимости от вида исследования, например, в случае анализов на туберкулез или молекулярно-биологических исследований, эти параметры могут быть ужесточены. См. также 5.2.6

### **5.3 Оборудование лаборатории**

- Требования к сбору образцов, имеющих отношение к выполняемым исследованиям
- Адекватное функционирование после его установки и валидация его функционирования
- Стандартные операционные процедуры
- Документирование его функционирования – указать важные моменты
- Выполнение работы компетентным персоналом (см. раздел «персонал»)
- Что делать при обнаружении дефектов
- Компьютерная система – см. «Информационная система лаборатории»

### **Приложение Б Лабораторная информационная система (ЛИС)**

- Является не просто дополнением, а требованием согласно 5.3.11
- Защита данных
- Валидация компьютерных программ
- Доступ
- Резервное копирование

### **4.7 Консультативные услуги**

- Способы информирования заказчика
- Выбор исследований
- Требуемый тип проб
- Частота повторов
- Интерпретация результатов
- Советы по индивидуальным клиническим случаям
- Большинство ошибок до проведения исследования (на преаналитическом этапе)
- Обсуждение путей и средств по уменьшению ошибок и недостатков, например, со стороны медсестер, занимающихся сбором проб
- Регулярное общение с клиницистами
- Плановые заседания и конференции с патологами

### **Процесс экспертизы**

#### **7. Процессы исследования**

*Процессы до проведения исследования*

4.5 экспертиза в отсылочной/реферальной лаборатории

5.4 процедуры до проведения исследования

*Процесс проведения исследования*

5.5 методики исследования

5.6 обеспечение качества методик исследования (отчасти)

*Процедуры, выполняемые после проведения исследования*

4.7 консультативные службы

5.7 процедуры после проведения исследования

5.8 предоставление отчета о результатах

## Большинство ошибок на преаналитическом этапе



Из M. Plebani: Errors in Clinical Laboratories. CCLM 2006, 44, 750–759

## Преаналитические проблемы

Недавняя конференция в Парме (опубликовано в журнале «Клиническая химия и лабораторная медицина») ISO 15189 – много внимания к преаналитическим факторам

Часто:

- Флеботомия и транспортировка не лежат в сфере юрисдикции лаборатории

По меньшей мере:

- Инструкция из лаборатории
- Активное участие при возникновении проблем

Возможно:

- Указывать на то, что подлежит аккредитации и что нет

## 5.4 Процедуры, выполняемые до исследования (преаналитические)

- 5.4.1 общая информация
- 5.4.2 информация для пациентов и пользователей
- 5.4.3 форма для запроса информации
- 5.4.4 первичные образцы и обращение с ними
  - 5.4.4.1 общая информация
  - 5.4.4.2 инструкции по подготовке к сбору образцов
  - 5.4.4.3 инструкции по сбору образцов
- 5.4.5 перевозка образцов
- 5.4.6 приемка образцов
- 5.4.7 работа с пробами до проведения исследования, подготовка и хранение

## Выполнение исследования (аналитика)

- Суть нашей работы
- Оборудование в должном порядке (валидированное)
- Реактивы в должном порядке (проверены, в пределах срока годности)
- Описанные методы (согласно СОП)
- Верифицированные или валидированные методы (чувствительность, специфичность, прослеживаемость, измерения неопределенности, избегать интерференций)
- Контроль качества на должном уровне (ВКК в пределах установленных границ, ВОК для межлабораторных сравнений)

## 5.8 Сообщение результатов

- Точное
- Своевременное (иногда в течение нескольких минут, иногда позже, но имеющее отношение к цели)
- Соответствующему лицу (конфиденциальность)
- Критические параметры сообщаются незамедлительно
- Проведение контроля до сообщения результатов
- Изменения сообщаются заказчику в ясной форме

## 5.8 Сообщение результатов

### 5.8.1 Общее

- Ясность: аккуратно, отформатированный вид, правильное написание, информация, относящаяся к интерпретации, информация о задержках предоставления извещения

### 5.8.2 Атрибуты сообщения

- Комментарии о качестве образца, которые могут повлиять на результат
- Комментарии о пригодности образца касательно критериев приемки/отказа в приемке
- Важные результаты
- Пояснительные комментарии, где необходимо

## 5.9 Опубликование результатов

### 5.9.1 Общее

- Лаборатория устанавливает документированные процедуры для отчетов о качестве образцов, тревожных или критических результатах, включая форму доклада (документировано), читабельно, предоставлено только соответствующему лицу, предварительный доклад, по телефону или в электронном виде соответствующему лицу

### 5.9.2 Автоматизированный сбор и выдача результатов

- Если в лаборатории есть система для автоматизированного сбора и выдачи результатов, необходимо установление документированной процедуры, которая включает в себя: критерии, утверждение до использования, интерференция образцов, выявленная в ходе анализа, доложенные аналитические предупреждения, идентифицируемые, можно быстро приостановить выдачу
- В ТС 212 (технический комитет) приводится много обсуждений на эту тему. В некоторых странах требуется подпись авторизованного лица

## Система управления качеством

### 4. Организация и Административная ответственность

- 4.1 организация и управление
- 4.4 рассмотрение контракта
- 4.15 анализ средств управления

### 5. Система управления качеством

- 4.2 система управления качеством
- 4.3 контроль документации
- 4.13 качество и технические записи

### **Общая политика качества**

- Документальное заявление вашей лаборатории об общих обязательствах поддержания качества
- Специфично для оснащения
- Заявление о намерениях в отношении качества
- Требования к системе проверки качества
- Весь персонал должен быть ознакомлен
- В свободном доступе

### **Значение руководства по обеспечению качества**

- Информировать штат о системе поддержания качества в лаборатории
- Обучать руководящий персонал лаборатории по выполнению административных функций
- Для описания системы управления качеством в лаборатории для экспертов/инспекторов/аудиторов
- Для описания системы управления качеством в лаборатории для потенциальных клиентов

### **4.3 Контроль документации**

Для вашей лаборатории потребуются:

- Процессы/процедуры для управления восьмью элементами контроля документации
- Рассмотрение и утверждение до использования
- Главный журнал регистрации документов
- Наличие лишь текущих одобренных версий (проверять соответствие между бумажными и электронными версиями)
- Периодическое рассмотрение, пересмотр и утверждение
- Изъятие недействительных документов
- Выявление устаревших документов
- Внесение поправок в документы от руки (если разрешено)
- Внесение поправок в документы через компьютеризированную систему

### **4.3 Контроль документации**

В 3-м издании эта глава изложена более ясно

4.3 Требования к документации

4.3.1 общее

4.3.2 руководство по качеству

4.3.3 контроль документации

4.1.3 управление записями

### 4.13 Качество и документы технического учета

Для вашей лаборатории потребуются:

- Процедуры для идентификации, сбора, индексации, доступа, хранения, поддержания, безопасного удаления
- Четко записанные документы  
От руки, принтерная печать на бумаге, более новые версии компьютерных программ, пригодные для чтения более старых электронных документов
- График хранения информации
- Бумажные документы и/или условия хранения для предупреждения неавторизованного доступа, повреждения, порчи, утраты

### Непрерывное улучшение

#### 8. Оценка и непрерывное улучшение

- 4.8 урегулирование претензий
- 4.9 обнаружение и управление несоответствиями
- 4.10 корректирующее действие
- 4.11 предупреждающее действие
- 4.12 непрерывное улучшение
- 4.14 внутренний аудит
- 5.6 обеспечение качества процедуры исследования (отчасти)

### Непрерывное улучшение

- Сбор мнений от клиентов и персонала
- Учиться на своих ошибках (поправки включают: анализ причин, обширность анализа, решение ключевых причин, проверка пригодности решения для данной проблемы)
- Предупреждать возникновение ошибок с использованием анализа рисков
- Аудит вашей системы
- Применение управленческого анализа для совершенствования вашей системы
- **Применяйте эти элементы из Стандарта ISO15189 и не расценивайте их как административное бремя**

### Сохраняйте вашу систему управления качеством в надлежащем виде

- 4.8 Урегулирование претензий
- 4.9 Идентификация и контроль за несоответствием требованиям
- 4.10 Корректирующие действия
- 4.11 **Превентивные меры**
- 4.12 **Постоянное совершенствование**
- 4.14 Оценка и аудит
  - 4.14.3 Оценка обратной связи с пользователями
  - 4.14.4 Предложения от персонала
  - 4.14.5 Внутренний аудит
  - 4.14.6 **Управление рисками**
  - 4.14.7 Индикаторы качества
  - 4.14.8 Рассмотрение внешними организациями
- 4.15 Анализ со стороны руководства

### Значение технических процедур

- Для предоставления одобренных инструкций для преаналитических, аналитических, а также постаналитических процедур
- Быть базой для обучения новых сотрудников и оценки компетентности
- Для преемственности качества работы технических операций лаборатории «Качество есть отсутствие вариаций»

### Почему так много документов?

- Единообразии коммуникаций
- Важно для эффективного тренинга
- Необходимо для системы управления качеством
- Если документ бесполезен, он должен быть немедленно изъят

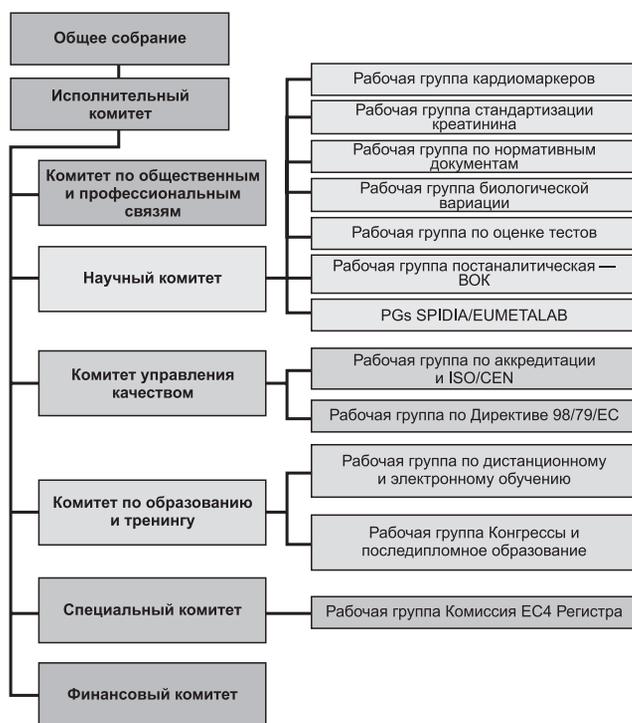
### Качество есть отсутствие вариаций

Идеальная производительность

Реальная производительность



### Структура Европейской федерации по клинической химии и лабораторной медицине (ЕФКХЛМ)



### Комитет по качеству и регламентам

- Поддерживает проведение эффективных схем аккредитации и системы менеджмента качества во всех европейских странах
- Связи с ISO, CEN и органами Европейской кооперации по аккредитации (EA)
- *Рабочая группа по аккредитации и ISO/CEN* представляет Европейскую федерацию клинической химии (ЕФКХ) в EA, ISO TC212 и CEN TC140. Рабочая группа сфокусирована на влиянии стандартов ISO/CEN и гармонизации аккредитации за счет международного инспектирования, образования и тренинга экспертов, имеющих отношение к специальным профессиональным стандартам ISO 15189, а также по запуску европейских процедур аккредитации с учетом гибкого подхода.
- *Рабочая группа по лабораторной диагностике* предоставляет руководство для применения Директивы в лабораторной практике, а также во время аккредитации лабораторий...

### Работа в Комитете ISO TC 212 и CEN TC140

Работа в рабочей группе TC212-WG1

- Работала по стандарту ISO15189, сейчас – по стандартам диагностики по месту лечения, системе управления рисками, преаналитическому руководству

Важные дополнительные пункты:

- Обсуждения погрешностей измерений
- Специальные стандарты для ряда специальных дисциплин (микробиология, молекулярная биология) и спецификации для производителей

### Что представляет собой аккредитация?

«это процедура, согласно которой компетентный орган дает официальное признание о том, что коллектив или лицо является компетентным для проведения специальных задач»  
ISO 15189:2007 definition 3.1

...это не «сертификация»

### Аккредитация является подтверждением пяти важных положений...

1. Компетентности и опытности персонала
2. Технического состояния и прослеживаемости оборудования и материалов
3. Технической пригодности методов
4. Правомерности и возможности применения результатов
5. Соответствия стандартам системы управления ISO

[www.ianz.govt.nz](http://www.ianz.govt.nz)

### Европейская кооперация по аккредитации (ЕА)

- Комитет по здравоохранению был учрежден примерно в 2000 г.
- Члены кооперации
  - Национальные организации по аккредитации
  - Европейская ассоциация производителей диагностических средств (индустрия лабораторной диагностики)
  - Профессионалы — рабочие группы по аккредитации Европейской федерации лабораторной медицины (EFLM)

### Вопросы для обсуждения

Недавний отчет по обсуждению специфических вопросов внутри ЕА

- Исследование по месту лечения
- Гибкий подход
- Преаналитика
- Обучение экспертов

Вим Хьюисман, CCLM 2012; 50: 1147-1152  
«Аккредитация европейской медицинской лаборатории. Современная ситуация и шаги к гармонизации»

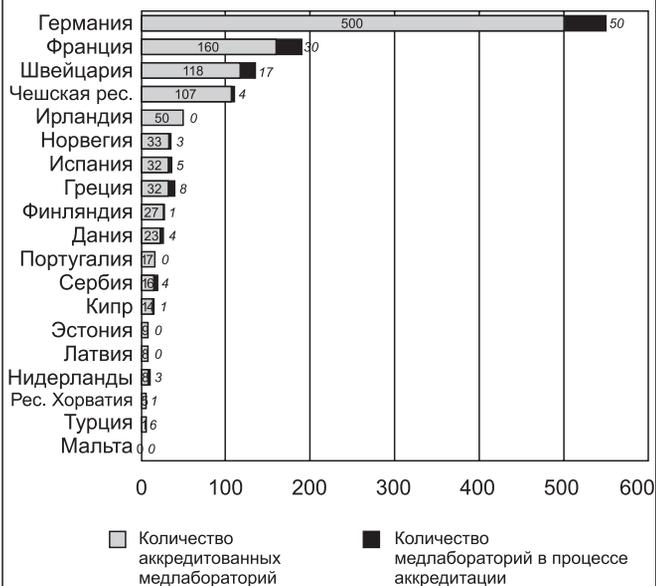
### Аккредитация в европейских странах

- ISO15189 является основным стандартом
- Постепенное увеличение числа (есть различия по странам)
- Результаты различных опросников ЕФКХЛМ и ЕА
- Рабочая группа ЕФКХЛМ 2009
- Рабочая группа ЕА НС 2011
- Рабочая группа ЕА НС 2013

### Процент аккредитованных медицинских лабораторий

0%	0,1–5%	6–15%	16–30%	31–50%	51–75%
МК, МТ РО, СИ	АТ, СН ДЕ, ЕС, FR, HU, IT, LV, RS	СЗ, ЛТ	BE, EE	–	NL, UK, SE
4	9	2	2		3

### Аккредитованные медлаборатории и лаборатории в процессе аккредитации



### Q1 Опыт аккредитации НС

Страна	Начало	Аккредитации	Эксперты (LA TA TE)		
Австрия	2005	3	3	6	2
Чехия	1999/2004	167	12	70	26
Франция	1997/2004	187	46	110	0
Кипр	2006	16	3	0	6
Эстония	1999/2004	10	1	12	2
Испания	2005	37	9	1(7)	30
Греция	2001/2007	40	6	20	26
Латвия	1996/2006	11	3	4	8
Швейцария	1995	118	11	0	50
Швеция	1992	75	6	55	4
Сербия	2002/2009	22	6/2	8	19

### Q1 Опыт аккредитации НС

Страна	Начало	Аккредитации	Эксперты (LA TA TE)		
Хорватия	2007	7	4	3	7
Румыния	2007	830	14	21	65
Финляндия	1995	22	5	42	
Норвегия	1995/2006	31	6	34	
Дания	1981/2001	25	3	23	
Германия	1995	490	34	79	9
Турция	2010	10	6	6	10
Бельгия	1994/2003	67	10	50	
Нидерланды	1995/2004	262	60	250	

### Современная ситуация: обязательная аккредитация



В ряде стран есть ограничения в конкретных областях

- РУМЫНИЯ:** оплата зависит от аккредитации
- БЕЛЬГИЯ:** молекулярная генетика
- ГЕРМАНИЯ:** новорожденные
- ШВЕЙЦАРИЯ:** генетика человека

### **Нужно ли делать процесс аккредитации обязательным?**

- В ряде стран большинство лабораторий получило аккредитацию без надлежаще заявленных требований или финансовой поддержки
- Точное внедрение ISO15189 осуществляется открыто для пользователя на интернет-сайте АВ
- Создает равные условия для лабораторий
- Однако для правильного применения нужны инвестиции

### **Необходимо участие сотрудников лаборатории**

- Работать в рамках ISO (Международная организация по стандартизации) и CEN (Европейский комитет по стандартизации) — TC 212 и TC140
- Работать согласно методическим документам
- Работать в органах Национальных Стандартов — Голосование осуществляется органами Национальных Стандартов
- Работать с вашим центром сертификации — как технический аудитор — в комитетах

### **Участие сотрудников лаборатории в проведении аудита**

- Аккредитация = компетентность = роль профессионалов
  - Калибровка
  - Круг качества, а не только инспекция

**Аккредитация согласно ISO15189 может действительно улучшить качество работы всех медицинских лабораторий как для пациента, так и для врача**

## ИШЕМИЧЕСКОЕ И НЕИШЕМИЧЕСКОЕ ПОВЫШЕНИЕ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ТРОПОНИНОВ: ИНТЕРПРЕТАЦИЯ, ОЦЕНКА РИСКОВ, ТЕРАПИЯ

**В. В. ВЕЛЬКОВ**

ЗАО «ДИАКОН», Московская обл., г. Пушкино

**Резюме.** Обзор информации, касающейся проблем высокочувствительных измерений циркулирующих концентраций кардиальных тропонинов и интерпретации их результатов. Внедрение этих тестов приводит к раннему выявлению большего количества ИМ, в особенности ИМ без элевации ST (ИМБСТ), чем диагностика, основанная на стандартных тропониновых тестах. В итоге значительная часть диагнозов, которые ранее неправомерно классифицировались как нестабильная стенокардия, с помощью высокочувствительных тропонинов реклассифицируется как ИМБСТ. Многочисленные исследования показали, что большая часть пациентов, поступающих с подозрением на острый коронарный синдром (ОКС), имеют повышенные уровни тропонинов, вызванные неишемическими причинами, связанными со структурными повреждениями миокарда различной этиологии. Примерно 75% лиц, поступающих с подозрением на ОКС, вообще не имеют повышенных уровней тропонинов. Из оставшихся 25% с повышенными высокочувствительными тропонинами — примерно половина имеют ишемическое повышение тропонинов, а другая половина — неишемическое. Более того, при равной степени повышения высокочувствительных тропонинов риск летальности у пациентов с неишемически повышенными тропонинами почти в два раза выше, чем при их ишемическом повышении.

Таким образом, кроме раннего выявления большего количества пациентов с ИМБСТ, высокочувствительные тропонины выявляют еще большее количество лиц с неишемическими структурными повреждениями миокарда, имеющими риск летальности, в два раза превышающий таковой у лиц с ишемическими повышенными высокочувствительными тропонинами. Приводятся международные рекомендации по дифференциальной диагностике ишемического и неишемического повышения высокочувствительных тропонинов, алгоритмы интерпретации измерений и проблемы, связанные с соответствующей терапией.

**Ключевые слова:** инфаркт миокарда, высокочувствительные тропонины, неишемическое повышение тропонинов.

## ISCHEMIC AND NON-ISCHEMIC ELEVATION OF HIGH SENSITIVITY TROPONINS: INTERPRETATION, RISK ASSESSMENT, THERAPY

**VELKOV V.V.**

CJSC "DIAKON", Moscow Region, City of Puschino

**Summary.** Here is presented a review of available literature about problems of high sensitivity detection used to measure concentration of circulating cardiac troponins as well as interpretation of its results. Introduction of such assays let to detect a high number of patients with myocardial infarction, in particular, a Non-ST-elevation myocardial infarction (NSTEMI) compared to approaches based on standard troponin tests. As a result, a substantial part of diagnoses used to be wrongfully classified as unstable angina may now be reclassified as NSTEMI owing to a high sensitivity troponin assay. Numerous studies have showed that a large number of patients with suspected acute coronary syndrome (ACS) admitted to the hospital have elevated levels of troponins due to nonischemic causes related to structural myocardial injuries of different etiology. About 75% of patients suspected with ACS do not have elevated troponin concentrations at all. The rest of 25% of patients with elevated high sensitivity troponins is divided into two halves where approximately 50% of them have ischemic increase of troponins and another 50% — of nonischemic origin. Moreover, while degree of elevation of high sensitivity troponins is the same, however, patients with nonischemic elevated troponins have almost 2 times higher lethality risk compared to patients with ischemic elevations of troponins.

Thus, apart from early detection of increasing numbers of patients with NSTEMI high sensitivity troponin assay let to detect even more individuals with nonischemic structural myocardial injuries who have a 2-fold higher lethality risk compared to people with ischemic elevated high sensitivity troponins. Recommendations developed by international scientific community on conducting a differential diagnosis of ischemic and nonischemic elevation of high sensitivity troponins are discussed including interpretation algorithms for measurements as well as problems for applying a proper therapy.

**Key words:** myocardial infarction, High Sensitivity Troponins, non-ischemic elevation of troponins.

### 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

**Международные диагностические критерии инфаркта миокарда: 1978, 2000, 2007, 2012...**

33 года прошло с тех пор, когда Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) предложила стандартизованные диагностические критерии ИМ [1]. За это время был достигнут значительный прогресс в разработке чувствительных и специфичных кардиомаркеров. И каждая стадия этого прогресса была связана с новой формулировкой всеобщих критериев инфарктов миокарда ИМ (universal definitions), сделанных в 2000, 2007 и в 2012 гг., см. обзоры [2, 3].

**Текущие диагностические критерии ИМ: ишемия, связанная и не связанная с ОКС**

Ныне действующее третье всеобщее определение ИМ (4) устанавливает следующие типы ИМ (рис. 1):

- ИМ тип 1. Спонтанный ИМ, связанный с ишемией вследствие первичного коронарного события (эрозия и/или разрушение, растрескивание или расслоение бляшки); этот тип считается связанным с ОКС;
- ИМ тип 2. Вторичный ИМ, связанный с ишемией, вызванной недостатком кислорода, например, при коронарном спазме, коронарной эмболии, анемии, аритмии, гипер- или гипотензии; этот тип считается не связанным с ОКС;
- ИМ тип 3. Внезапная коронарная смерть (включая остановку сердца), часто с симптомами предполагаемой ишемии миокарда — ожидаемой новой элевацией

ST и новой блокадой левой ножки пучка Гиса, выявлением свежего тромба коронарной артерии при ангиографии и/или аутопсии, а также смерть, наступившая до получения образцов крови или перед повышением концентрации маркеров;

- ИМ тип 4а. ИМ, ассоциированный с чрезкожным коронарным вмешательством ЧКВ (ИМ-ЧКВ);
- ИМ тип 4б. ИМ, связанный с тромбозом стента, подтвержденным ангиографией или на аутопсии;
- ИМ тип 5. ИМ, ассоциированный с аорто-коронарным шунтированием (АКШ-ИМ).

При этом предусматривается, что основным лабораторным средством для диагностики ИМ является высокочувствительное определение циркулирующих концентраций кардиальных тропонинов hscTnT или hscTnI (hs — high sensitive, высокочувствительный, англ.) (4).

К чему на практике привело повышение чувствительности и специфичности кардиомаркеров и применение новых критериев ИМ? Результаты внедрения этих критериев представлены на рис. 2. Прогресс впечатляет. Количество выявляемых ИМ без элевации ST сегмента (ИМБСТ) возросло в два раза, количество неправоммерно диагностируемых случаев нестабильной стенокардии сократилось в два раза. Особенно резкое повышение выявления ИМБСТ (на 14%) произошло благодаря высокочувствительным тропонинам. Клиническое значение этого трудно переоценить.

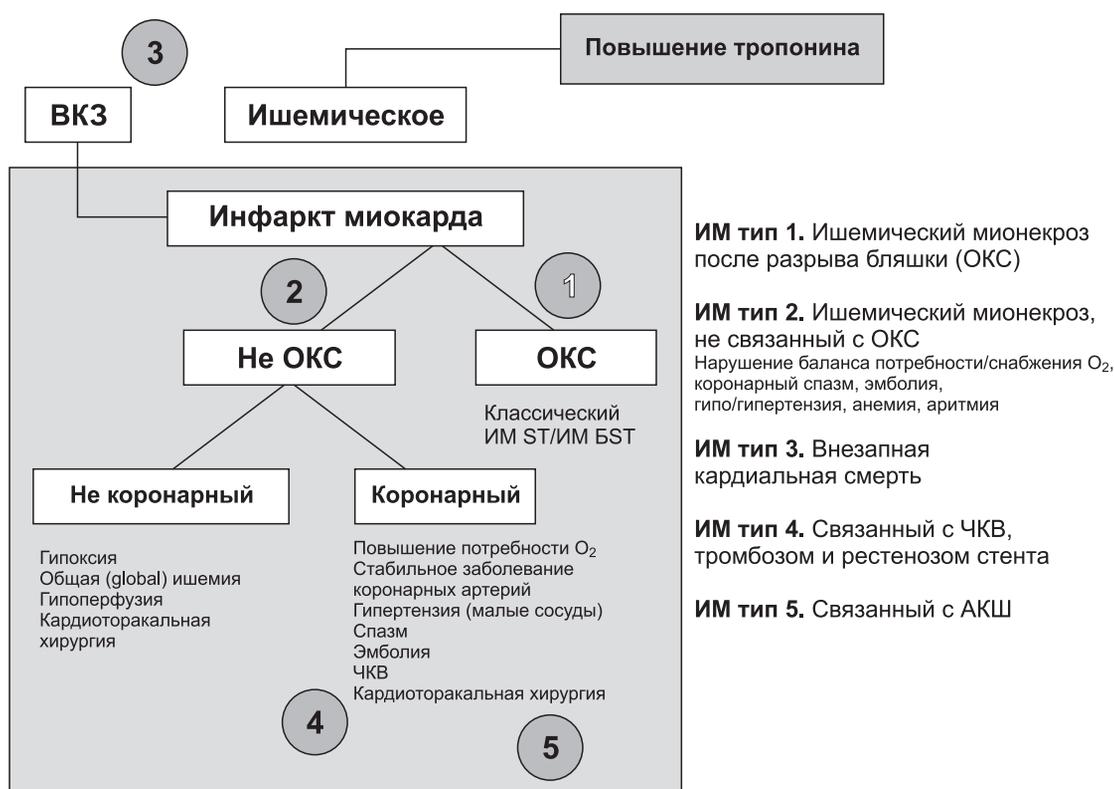


Рис. 1. Типы ИМ и их патофизиологические характеристики [5]

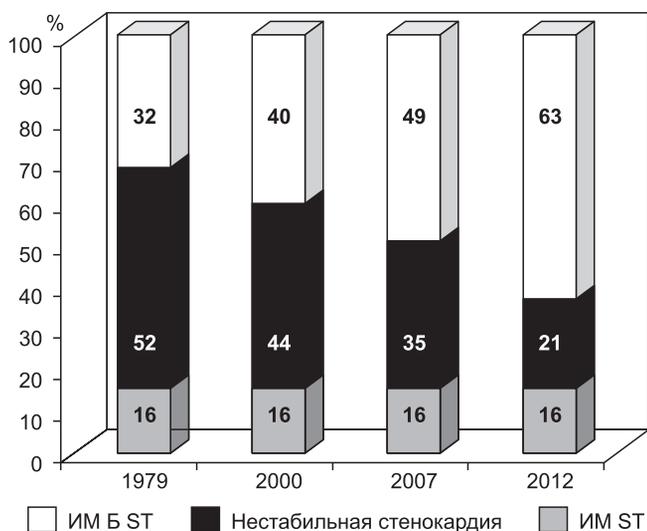


Рис. 2. Изменение доли диагнозов: ИМ с элевацией ST сегмента (ИМСТ), ИМБСТ и нестабильная стенокардия среди пациентов, поступающих с подозрением на острый коронарный синдром, в зависимости от диагностических критериев ИМ: 1979 — критерии ВОЗ, 2000 — первое всеобщее определение ИМ, 2007 — второе, 2012 — третье [6]

Причина, из-за которой были предложены первое и второе всеобщие определения ИМ, рекомендовавшие преимущественное определение тропонинов, была следующей: тропонины выявляют большее количество случаев ИМ, чем ККМБ (креатинкиназа, изоформа МБ).

Недавно опубликованы результаты анализа эффективности диагностики ИМ с помощью трех различных критериев. Такими критериями были: 1) типичные симптомы и персистенция элевации ST сегмента или блокада левой ножки пучка Гиса — «ИМСТ критерий»; 2) повышение КК МБ и типичные симптомы ишемии — «КК МБ критерий» и 3) повышение сTnI и типичные симптомы ишемии — «сTnI критерий». Было показано, что критерии ИМ согласно элевации ST сегмента и повышению активности КК МБ не выявляют значительное количество пациентов, имеющих в течение 10 лет высокий риск летальности, в то время как тропонины дополнительно выявляли значительное количество случаев ИМБСТ, с помощью КК МБ не выявляемых. В целом, «в популяции с широким спектром ОКС первое всеобщее определение ИМ, основанное на измерении тропонинов, повышало количество диагнозов ИМ на 25%» [7]. Высокочувствительные тропониновые тесты выявляют еще большее количество случаев ИМБСТ, чем т. н. «стандартные». В итоге значительное количество пациентов, у которых на основании стандартных сTn тестов диагностируется нестабильная стенокардия, с помощью высокочувствительных будут отнесены к группе с ИМБ ST.

Весьма показательны в этой связи результаты двух проспективных исследований, направленных на выяснение клинических последствий внедрения в практику hscTnI тестов. В первой фазе исследования [8] наблю-

дали 1038 пациентов, поступивших с признаками ОКС. Измеряли сTnI, тест Abbott Architect, 99-я перцентиль — 0,012 нг/мл, коэффициент вариации (КВ) — 20,8%. Диагностическим уровнем для ИМ считали > 0,20 нг/мл, и пациентам с диагнозом ИМ, поставленным согласно этому критерию, проводились соответствующие мероприятия. Во второй фазе (1054 пациента с признаками ОКС) пограничный уровень для ИМ снизили в 4 раза — до 0,05 нг/мл, КВ — 7,2%. В течение одного года фиксировались неблагоприятные исходы: повторные ИМ и кардиоваскулярная смерть. Показано, что снижение пограничного уровня сTnI в 4 раза повысило количество выявленных ИМ на 29% и привело к снижению количества повторных ИМ в 2,6 раза и смертности в 1,9 раза (наблюдение 1 год) (8). В следующем проспективном исследовании (наблюдались 2092 пациента, имевших при поступлении признаки ОКС) пограничным для ИМ считали прежний уровень — 0,05 нг/л. Однако в течение года регистрировали исходы и у пациентов, у которых при поступлении hscTnI был ниже пограничного и находился в диапазоне от 0,012 (99-я перцентиль) до 0,049 нг/мл. Пациенты с уровнями <0,050 и >0,012 нг/мл полагались не имеющими ИМ. Оказалось, что «снижение диагностического уровня hscTnI до 99-й перцентили повышает количество выявленных пациентов с высоким риском неблагоприятных исходов и повышает количество диагностируемых ИМ на 47%» [9].

*Существенно, что измерение концентраций тропонина T и тропонина I дает практически идентичную клиническую информацию, и выбор между этими тестами обычно зависит от того, какое оборудование и какой поставщик будут выбраны для центральной лаборатории. По патентным причинам сTnT тесты выпускаются только одним производителем, тесты на сTnI — разными. В настоящее время (июнь 2013 г.) в США система медицинского страхования Medicare платит за измерение уровня высокочувствительного тропонина 13–18 долларов [10].*

### Почему hscTn тесты выявляют те инфаркты, которые ранее не выявлялись?

Обычно полагается, что тропонины если и выходят в циркуляцию, то только из зоны мионекроза. Чем больше зона — тем выше уровень тропонинов; в норме, как считалось, тропонинов в кровотоке нет. Такая точка зрения основывалась на малой чувствительности стандартных тропониновых тестов. Действительно, если тест имеет низкую чувствительность и нижний предел определения тропонина высокий, такой тест способен определять только высокие уровни тропонинов. И можно сказать, что такой тест *a priori* «заточен» на выявление только обширных инфарктов; пациенту приходится ждать 8–10 часов, пока ИМ не разовьется до тяжести, которую способен зафиксировать стандартный тропониновый тест. Причин, по которым пациент может этого не дожидаться, разумеется, две.

Если тест высокочувствительный и минимально определяемые концентрации — низкие, зону мионекроза можно зафиксировать в самом начале ее развития и это развитие остановить. Однако, когда такие тесты в 2006–2007 гг. были созданы, оказалось, что они определяют тропонины и у практически здоровых людей, не имеющих очевидных ни кардиальных, ни других патологий, способных повышать тропонины. В результате появился новый термин «нормальный уровень тропонина», «тропонин-отрицательных» не стало, см. обзоры [6, 10–14].

В результате многочисленных исследований было установлено, что нормальные уровни тропонинов находятся в диапазоне концентраций от 1 до 5 нг/л. Уровень, соответствующий 99-й перцентили нормальной популяции (иначе говоря, верхний предел нормы, или верхний референсный уровень; при таком уровне 99 здоровых лиц имеют истинно отрицательный результат и только один индивид — ложно положительный), находится в диапазоне 12–20 нг/л, в зависимости от конкретного высокочувствительного теста (см. ниже). «Откуда же берутся тропонины в норме»?

#### Механизмы нормального выхода тропонинов в циркуляцию

Полагается, что в норме причины выхода тропонинов в кровотоки могут быть следующими [15, 16]:

1) *нормальный метаболизм миоцитов*. На протяжении жизни обновлению подвергаются около 50% кардиомиоцитов;

2) *высвобождение продуктов протеолитической деградации тропонинов из миоцитов*. Такой процесс может происходить без гибели миоцитов и без нарушения целостности их клеточных мембран. В результате протеолиза образуются мелкие фрагменты тропонинов, которые проходят через клеточные мембраны;

3) *повышенная проницаемость клеточных стенок*. Обратимое повреждение мембран кардиомиоцитов при напряжении миокарда или при транзиторной ишемии позволяет тропонинам цитозоля выходить в кровотоки;

4) *образование и высвобождение мембранных везикул*;

5) *маломасштабный некроз миоцитов*. Этот наиболее частый процесс может усиливаться ишемическим или воспалительным состоянием, прямой травмой и токсическими причинами, включая сепсис;

6) *апоптоз, или запрограммированная смерть клеток*. Апоптоз при сохранении целостности клеточных мембран связан с активацией каспаз, вызывающих деградацию структурных белков миокарда. Это может приводить к выходу тропонинов и их фрагментов в кровотоки [15, 16].

#### Механизмы выхода тропонинов при ишемии

**Транзиторная ишемия.** Как оказалось, транзиторный выход тропонинов в циркуляцию наблюдается у здоровых лиц при интенсивных физических нагрузках,

например, после марафонских забегов [17]. После финиша уровни hscTn возвращаются к норме через 72 ч [18]. Повышаются тропонины и при стресс-тестах, проводимых пациентам со стабильными заболеваниями коронарных артерий, при этом такое повышение прямым образом связано с тяжестью ишемии, присутствующей у конкретного пациента [19].

**Ишемическое повреждение миокарда.** Тропонины в миоцитах содержатся в двух пулах: в структурном, когда тропонины находятся в миофибриллах, и в цитозольном — когда они находятся в свободном от миофибрилл состоянии и в комплексе с другими тропонинами. Количество цитозольных тропонинов составляет 3–6% от общего пула.

При повреждениях и напряжениях миокарда различной этиологии «миофибрильный» и «цитозольный» тропонины выходят в кровь. Но с разной кинетикой. Цитозольный пул выходит в кровотоки при раннем развитии повреждений миокарда. Высокочувствительные hscTn тесты фиксируют именно этот ранний выход цитозольных тропонинов в кровотоки и отражают динамику этого процесса. Следующий и относительно длительный выход тропонинов уже из разрушенных миофибрилл связан с более серьезными повреждениями миокарда, которые, чем тяжелее, тем более необратимы [20, 21].

Считается, что «выход тропонинов из структурного пула — это показатель клеточной смерти, а выход тропонинов из цитозольного пула может быть связан как с обратимыми, так и с необратимыми повреждениями» [16].

**Нарушение перфузии.** Связаны ли повышенные уровни hscTnT у пациентов, поступающих с признаками ИМ, с нарушениями перфузии, выявляемыми с помощью имаджинга, в частности, с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОЭКТ) и компьютерной томографической ангиографии (КТА)? Наблюдала 117 лиц (средний возраст 55 лет), поступивших с подозрением на ОКС, из которых 42 индивида (36%), согласно данным ОЭКТ и КТА, были признаны не имеющими кардиальной патологии. У этих индивидов уровни hscTnT составляли 3,58 нг/л против 5,63 нг/л у лиц с ОКС, а уровни высокочувствительного С-реактивного белка (hsCRP) 0,82 мг/л против 1,93 мг/л соответственно [22].

Другое исследование проводилось при наблюдении 138 пациентов (возраст 54 года +/- 11 лет), поступивших с острой сердечной болью, которым (находящимся в состоянии покоя: отсутствие физических нагрузок) проводилось однократное измерение hscTnT. Нарушения перфузии выявлялись с помощью ОЭКТ (64 среза), а тяжесть заболеваний коронарных артерий — с помощью КТА. Оказалось, что у пациентов с нарушенной перфузией, выявляемой ОЭКТ, уровни hscTnT составляли 9,41 нг/л против 4,89 нг/л у пациентов с нормальной картиной ОЭКТ. Чувствительность hscTnT для выявления нарушенной перфузии согласно ОЭКТ составляла

80–90%, отрицательное предиктивное значение — 96%. При этом повышение hscTnT было связано также с тяжестью коронарного атеросклероза, выявляемого с помощью КТА. Авторы полагают, что «у пациентов с острой сердечной болью уровень hscTnT, измеряемый в состоянии покоя, является предиктором нарушения миокардиальной перфузии и тяжести заболеваний коронарных артерий» [23].

Что касается оценки остаточной реперфузии после перенесенного ИМ, есть данные, что в течение одного дня после ИМ кинетика выхода тропонинов (стандартный тест) из цитозольного пула связана с интенсивностью остаточной реперфузии и с размером зоны инфаркта и, таким образом, эта кинетика может служить показателем эффективности проводимых мероприятий и качества восстановления микроциркуляции в зоне ОИМ.

Как отмечалось, выход в циркуляцию структурного пула тропонинов — это результат уже необратимой деградации контрактильного аппарата, после острого коронарного события такая деградация может продолжаться в течение двух недель. Уровни cTn, измеряемые в течение 2–4 суток после ИМ, отражают деградацию саркомер и коррелируют с обширностью зоны ИМ, определяемой с помощью гистопатологии и имаджинга [21].

Следующий вопрос — в какой форме тропонины выходят в циркуляцию? В виде индивидуальных молекул cTnT и cTnI?

#### **В кровотоке циркулирует смесь различных тропонинов, их комплексов и продуктов, их модификации и деградации**

Многолетние исследования показали, что после выхода из миокарда тропонины циркулируют как: индивидуальные молекулы cTnT и cTnI; бинарные комплексы cTnI-cTnC и тройные комплексы cTnI-cTnC-cTnT. Более того, при ИМ в крови присутствуют продукты протеолитической деградации тропонинов и также фосфорилированные и окисленные формы как индивидуальных тропонинов, так и их комплексов. При этом у разных пациентов соотношение концентраций всех этих форм cTnI и cTnT и их комплексов индивидуальное и может зависеть от тяжести и длительности ишемии [24–27].

Таким образом, «в лице тропонина» мы имеем анализ «с тысячьо лиц», выражение которых может меняться от пациента к пациенту и «от часа к часу» [28].

Какое из этих «лиц» должны узнавать (определять) тропониновые тесты? Все сразу? Действительно, высокая и меняющаяся гетерогенность циркулирующих тропониновых комплексов приводит к серьезным трудностям в определении их концентрации. Обычно концентрацию индивидуального белка определяют с помощью специфических антител, как правило, моноклональных, связывающихся с каким-то одним специфическим участком белковой молекулы (эпитопом). Однако, как указывалось, циркулируют не индивиду-

альные и нативные молекулы cTnT и cTnI, а их комплексы и продукты их деградации и модификации, в которых могут отсутствовать те эпитопы, к которым были получены моноклональные антитела, применяемые для тестирования. Разумеется, для высокочувствительного определения концентрации «аналита с тысячьо лиц» применяют диагностические реагенты, содержащие не тысячи различных моноклональных антител, но обычно около десятка и более. Еще одна трудность — эффективность связывания моноклональных антител с эпитопами может зависеть от наличия гетерофильных антител, от аутоантител и т. д. [29, 30].

В целом, такая эпитопная вариабельность и динамичность гетерогенной популяции циркулирующих тропонинов привела к тому, что различные производители, чтобы улучшить чувствительность, включают в hscTn тесты большое количество различных моноклональных антител, узнающих различные эпитопы, которые могут находиться в различных тропониновых комплексах и в продуктах их деградации и модификации. В итоге тесты различных производителей имеют: 1) разные количественные показатели чувствительности (нижний предел определения), 2) разные значения 99-й перцентили и 3) разные значения диагностических уровней. Поэтому значения уровней, соответствующих 99-й перцентили, являются специфическими и индивидуальными для различных диагностических тестов различных производителей. Так, значение 99-й перцентили теста hscTnI Singulex Erenna — 8,0 нг/л; теста hscTnI Abbott ARCHITECT — 12 нг/л; теста hscTnT Roche — 14 нг/л; теста hscTnI PATHFAST Mitsubichi — 20 нг/л; теста hsTnI ADVIA Centaur Siemens — 40 нг/л) [см. обзоры 2, 3, 10–14]. В итоге «сравнение абсолютных концентраций тропонинов, измеренных с помощью тестов различных производителей, невозможно» [31].

*Сравнивать между собой абсолютные значения hscTn измерений можно лишь тогда, когда они получены с помощью тест-системы одного и того же производителя. Однако сравнение относительных значений динамики повышения или снижения уровней hscTn (в %) возможно и тогда, когда результаты получены с помощью тест-систем различных производителей.*

hscTn тесты классифицируются по степени их чувствительности, т. е. согласно проценту лиц нормальной популяции, у которых определяется концентрация cTn ниже верхнего предела нормы (99-й перцентили). Лучший тест уровня 1 (или «стандартный», не высокочувствительный) обнаруживает тропонин у < 50% здоровых лиц. Тест уровня 2 (первое поколение hs тестов) — у 50–75%; уровня 3 (второе поколение hs тестов) — у 75–95%. Тесты четвертого уровня (третье поколение hs тестов) — у > 95% «здоровых» лиц [32].

Итак, разные hscTn тесты имеют различные значения 99-й перцентили здоровой популяции, однако популяции могут быть разного возраста, разного пола и только относительно здоровыми.

### Проблема 99-й процентиля

Какие факторы влияют на уровень hscTn в общей популяции? Иначе говоря, какая популяция может быть референсной? В данный момент информация о том, какие именно факторы могут влиять на популяционные уровни hscTn, только начинает накапливаться. Исходно уровень сTnT (тест Roche hscTnT), соответствующий 99-й процентилю нормальной популяции, был установлен как 14 нг/л, при этом популяцию составляли практически здоровые индивиды возрастом от 20 до 70 лет [33]. Однако типичные пациенты, поступающие с признаками ОКС, — это пожилые люди. И весьма часто с большим количеством сопутствующих заболеваний, включающих гипертензию, сахарный диабет, хронические болезни почек и др. [34]. Действительно, у 22% практически здоровых лиц возрастом более 70 лет обнаруживаются повышенные (> 99-й процентиля) уровни hscTnI [35, 36].

Закономерный вопрос: каким должен быть уровень 99-й процентиля для пожилых пациентов? В многоцентровом исследовании у 406 лиц разного возраста, поступивших с признаками ОИМ, эффективность пограничного уровня hscTnT (99-я процентиля — 14 нг/л) для дискриминации между ОИМ и «не ОИМ» составляла: для лиц < 70 лет имела чувствительность — 88%, специфичность — 86%; для лиц > 70 лет чувствительность — 98%, специфичность — 49%. Для лиц старше 70 лет оптимальный пограничный уровень для ОИМ составлял 54 нг/л, что соответствует четырехкратному верхнему референсному уровню или (99-я процентиля × 4), чувствительность — 79%, специфичность — 96%. Для пациентов моложе 70 лет — 17 нг/л, чувствительность 88%, специфичность 90% [37]. В другом исследовании у пациентов возрастом старше 75 лет пограничный уровень hscTnT, равный 86,8 нг/л (99-я процентиля × 6), снижал количество ложноположительных диагнозов почти на 90% [38].

В специальном исследовании было установлено, что при поступлении с подозрением на ОКС у пациентов возрастом до 75 лет преобладали диагнозы ОКС и ИМ-БСТ, а у тех, кому за 75, — «не ОКС». Доля пациентов с повышенным hscTnT составляла у пациентов старше 75 лет 89,1%, а у пациентов моложе 75 лет — 73,3%, отношение рисков (ОР) — 1,2. При этом, как указывалось, у более молодых пациентов hscTnT был повышен преимущественно из-за ОКС, а у пожилых пациентов — из-за «не ОКС», ОР — 1,3. Оптимальный пограничный уровень для диагноза ИМБСТ у пациентов моложе 75 лет составлял 12,9 нг/л, а для пациентов старше 75 лет — 32,9 нг/л (в 2,5 раза выше) [39].

В проспективном исследовании CHS (Cardiovascular Health Study) индивидов с исходно измеренными уровнями hscTnT наблюдали в течение от 2 до 3 лет. Обнаружилось, что повышение hscTnT в течение наблюдаемого периода на 50% было связано с повышением риска смертности и сердечной недостаточности, а снижение — с по-

нижением риска. Это свидетельствует о том, что риск, связанный с повышенными уровнями hscTn, является модифицируемым [40]. Таким образом, значения верхнего референсного уровня hscTn для пожилых пациентов должны быть более высокими. Очевидно, что повышение тропонинов, связанное с возрастом, вызывается не острыми ишемическими причинами. Действительно, тропонины — биомаркеры, специфические для миокардиальных повреждений, но не специфические по отношению к их механизмам. Повышение тропонинов может быть и неишемическим и иметь много разных причин.

Основной критерий, отличающий ишемическое от неишемического повышения тропонинов: динамика тропонинов после поступления пациента. Ишемическое повышение, связанное с острым коронарным событием (тромб, спазм и др.), отражается в повышении тропонинов, связанном с увеличением зоны мионекроза, расположенной дистально по отношению к повреждению, неишемическое характеризуется постоянно (хронически) повышенной концентрацией тропонинов [5, 41].

### Неишемическое повышение hscTn

Какая доля пациентов, поступающих с подозрением на ИМ, имеет неишемическое повышение тропонинов? В раннем исследовании было обнаружено, что среди 2944 лиц, поступивших с признаками ИМ, только 23,8% имели повышенный hscTnI. Из них 20,4% имели ИМ типа 1, а 9,1% — ИМ типа 2. У 65,8% пациентов, имевших повышенный hscTnI, ИМ диагностирован не был [42]. В другом исследовании обнаружилось, что среди пациентов, поступивших с загрудинной болью, только 15% имели hscTnT выше уровня, диагностического для ИМ, но только 2% из них действительно имели ИМ [43]. Недавно было установлено, что среди 1181 пациента, поступившего с острой сердечной болью, 48,4% имели некардиальные причины болевого синдрома. При этом только 15% пациентов имели повышенные уровни hscTnT (>14 нг/л, 99-я процентиля) и менее 50% всех случаев их повышения можно было объяснить известными кардиальными или некардиальными заболеваниями. С повышенными hscTnT оказались связанными (по мере убывания степени корреляции): возраст, скорость клубочковой фильтрации, гипертензия, предшествовавший ИМ, ХБП [44]. На рисунке 3 представлены соотношения различных диагнозов, среди пациентов, поступивших с подозрением на ИМ [6].

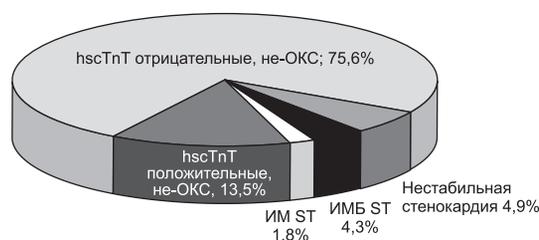


Рис. 3. Диагнозы 3327 пациентов, поступивших в течение 6 месяцев в госпиталь Гейдельбергского университета с признаками ОКС [6]

Итак, примерно четверть лиц здоровой популяции и половина пациентов, поступающих с признаками ИМ, могут иметь неишемически повышенные высокочувствительные тропонины.

### Имеют ли клиническое значение неишемически повышенные тропонины?

Среди 21 668 пациентов, при выписке имевших повышенные уровни сTn, 57,2% имели патологии, не связанные с ОКС, среди которых наиболее распространены были застойная сердечная недостаточность (1661 пациент) и хронические заболевания коронарных артерий (1648 пациентов). Через год после выписки смертность у пациентов с «не-ОКС повышенными» тропонинами составляла 22,8% и была выше, чем у пациентов с «ОКС повышенными тропонинами», отношение рисков – 1,39 [45]. В специальном исследовании 615 пациентов, в течение 1 года поступивших с сердечными приступами и имевших повышенный hscTnT, были разделены на две группы: группа «ОКС» («тромботическое повышение тропонина») и «не-ОКС» (не тромботическое повышение сTnT). В группе «ОКС» было 53% пациентов, в группе «не-ОКС» – 41%, у 6% лиц диагноз был неопределенный. При этом у «не-ОКС» пациентов смертность как внутриспитальная, так и в течение двух лет была более чем в два раза выше, чем у пациентов с ОКС. Авторы сделали вывод, что *среди пациентов, госпитализированных с подозрением на ОКС, «неспецифическое повышение тропонинов является распространенным и связанным с неблагоприятным прогнозом»* [46]. В недавнем наблюдении 3327 пациентов, поступивших в отделение неотложной кардиальной помощи госпиталя Гейдельбергского университета, оказалось, что только 20% пациентов при поступлении имели уровни hscTnT > 99-й перцентили, среди них у 69% повышенные hscTnT не были связаны с ОКС [6]. На рисунке 4 – смертность от всех причин у пациентов с ОКСБСТ (А) и у пациентов, не имевших ОКС (Б), в зависимости от уровней hscTnT при поступлении. Таким образом, *при одинаково повышенных уровнях hscTnT смертность у пациентов без ОКС в два раза выше, чем у пациентов с ОКСБСТ.*

«Хотя клиницисты часто считают<sup>1</sup> повышенные уровни тропонинов, не связанные с ОКС, не имеющими значения и используют такие термины, как «тропонинемия» или «тропониноз» (troponinemia, troponinosis), такое повышение имеет важное прогностическое значение» [10]. Повышенные при поступлении уровни hs-cTn (> 99-й перцентили), независимо от причины их повышения, являются независимыми предикторами неблагоприятных исходов [4–49].

<sup>1</sup> В подлиннике [10] – «часто опошляют» – frequently trivialize – прим. авт.

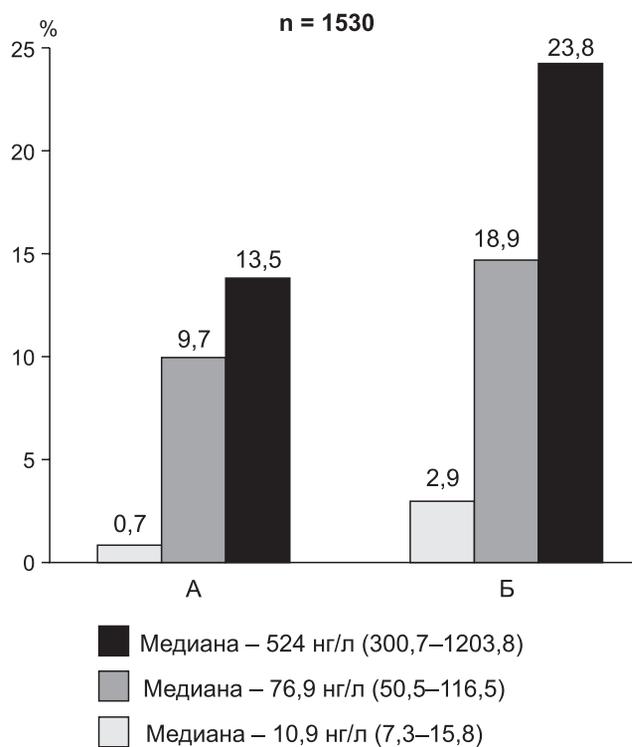


Рис. 4. Общая смертность 1530 пациентов, поступивших с подозрением на ИМ и имевших диагностированный ОКСБСТ (А) и не имевших ОКС (Б). Указаны медианные уровни hscTnT при поступлении. Наблюдение – 6 месяцев [6]

«Все эти данные приводят к выводу, что количество показаний для тестирования тропонинов в ситуациях, отличных от ОКС, будет увеличиваться и что измерения сTn с помощью hscTn тестов всегда должны рассматриваться для стратификации риска не только при ОКС, но и в случаях, не связанных с ОКС» [6].

### С какими патологиями связаны неишемические повышения тропонинов?

**Стабильная стенокардия.** Тропоины «вытекают» из некальцифицированных бляшек. У 128 пациентов со стабильной стенокардией проводилось определение hscTnT и исследование бляшек с помощью КТА [50]. Оценивались: 1) степень коронарной кальцификации; 2) тяжесть стеноза, 3) объем некальцифицированных бляшек; 4) свойства бляшек (мягкие или смешанные, некальцифицированные или кальцифицированные); 5) наличие васкулярного ремоделирования в зонах некальцифицированных бляшек. Оказалось, что у 22,6% из 124 пациентов уровни hscTnT были повышены ( $\geq 14$  пг/мл). Именно у этих лиц были обнаружены следующие корреляции: 1) слабая, но достоверная между hscTnT и степенью кальцификации и 2) множественностью кальцифицированных бляшек. У пациентов с некальцифицированными бляшками уровни hscTnT составляли  $12,6 \pm 5,2$  пг/мл, у пациентов с нормальными сосудами –  $8,3 \pm 2,6$ , у пациентов, имевших только кальцифицированные повреждения, –  $8,8 \pm 3,0$  пг/мл.

Существенно, что у лиц с ремоделированными некальцифицированными артериями были самые высокие уровни hscTnT, составлявшие  $26,3 \pm 6,5$  пг/мл. Это позволяло с высокой точностью с помощью измерения hscTnT идентифицировать пациентов с ремоделированными некальцифицированными бляшками, значение AUC ROC = 90. Авторы полагают, что «источником хронически повышенного тропонина потенциально могут быть хронически молчащие разрывы некальцифицированных бляшек». В свете исследований, выполненных с помощью имаджинга, становится ясным, что у пациентов с ремоделированными некальцифицированными бляшками особенно высок риск развития ОКС. Авторы считают, что *хронически повышенный «hscTn может быть маркером уязвимых коронарных повреждений даже при стабильных заболеваниях коронарных артерий»* [50].

**Гипертрофия левого желудочка.** При наблюдении 3546 пациентов, имевших различные ССЗ, было обнаружено, что стандартный cTnT был повышен у 0,7% лиц, а hscTnT — у 25,0%. При этом hscTnT был повышен: 1) у 37,1% мужчин и у 12,9% женщин, 2) у 14,0% лиц моложе 40 лет и у 57,6% у лиц от 60 лет и старше. При низких уровнях hscTnT гипертрофия ЛЖ имела место у 7,5%, а при повышенных — у 48,1% лиц. В течение наблюдения (6,4 года) при низких уровнях hscTnT смертность от всех причин составила 1,9%, при высоких — 28,4% [51]. В другом исследовании наблюдались 3679 пациентов со стабильными заболеваниями коронарных артерий и сохраненной фракцией ЛЖ. Наблюдение — 5,2 года. Повышенные уровни hscTn ( $>14$  нг/л) были обнаружены у 11,1% пациентов и оказались связанными с повышенным риском неблагоприятных исходов (кардиоваскулярная смерть, сердечная недостаточность), отношение рисков 2,09, но не с риском ИМ [52].

**Повышенный hscTn и субклиническое «молчащее» повреждение миокарда.** В специальном исследовании наблюдали 300 индивидов, не имевших симптомов ССЗ. Цель — выявление молчащих повреждений миокарда с помощью hscTnT, BNP и имаджинга. У 34% индивидов были выявлены: миокардиальная ишемия, гипертрофия ЛЖ, систолическая дисфункция, диастолическая дисфункция, увеличение левого предсердия. Маркерами, которые выявляли эти патологии, являлись hscTnT и BNP. Наиболее часто выявляемыми были: 1) гипертрофия ЛЖ (29,7%); 2) диастолическая дисфункция (21,3%); 3) увеличения левого предсердия (15,3%); 4) систолическая дисфункция (6,3%) и 5) ишемия (6,3%). Значения AUC ROC для выявления этих патологий составляли 0,78 для всех пациентов, 0,82 для мужчин [53]. В другом исследовании у 98 пациентов (возраст  $62 \pm 7$  лет) со стабильными заболеваниями коронарных артерий измеряли ультрасенситивный uscTnI (Singulex Erenna System, нижний предел определения — 0,4 нг/л, 99-я перцентиль — 10,1 нг/л). Средние уровни uscTnI в исследуемой когорте составляли 6,1 нг/л. У 15% пациентов уровни uscTnI были повышены. Наиболее

повышенными они были у пациентов с молчащей ишемией (17 пациентов) и составляли  $16,1 \pm 23,0$  против  $5,1 \pm 7,9$  нг/л у лиц без ишемии. В целом, *уровни uscTnI были связаны с максимальной депрессией ST-сегмента и с общей тяжестью ишемии в течение 24 ч.* Авторы заключили, что «концентрации тропонина выше пограничного уровня, рекомендованного для диагностики ИМ, обнаруживаются у 1 из 6 пациентов со стабильными заболеваниями коронарных артерий и частично отражают обратимую молчащую ишемию» [54].

В аналогичном исследовании определяли связь между уровнями hscTnT, NT-proBNP и повышенной массой ЛЖ у 1973 пациентов возрастом  $73 \pm 5$  лет. Показано, что 24,8% лиц имели повышенную массу ЛЖ. Медианные уровни hs-cTnT и NT-proBNP были более повышены у пациентов с повышенной массой ЛЖ, чем у лиц с нормальной массой ЛЖ (hscTnT — 6,6 нг/л против 4,6 нг/л и NT-proBNP — 147 нг/л против 79 нг/л соответственно). При этом повышение уровней hscTnT было связано с повышением тяжести гипертрофии ЛЖ. Таким образом, у пожилых индивидов повышение hscTnT даже в зоне его низких концентраций связано с последующим высвобождением hscTnT в циркуляцию, что отражает молчащие субклинические патофизиологические изменения ЛЖ [55].

**Сердечная недостаточность.** Повышение hscTn, характерное для миокардиального некроза, наблюдается почти у всех пациентов с СН, особенно у лиц с острой декомпенсированной СН. Хотя ИМ типа 1 и является важной причиной декомпенсированной СН и его вероятность должна всегда рассматриваться при поступлении пациентов с ОСН, одно только повышение cTn при СН не может считаться достаточным для постановки диагноза ИМ [56].

В специальном исследовании у 202 пациентов, поступивших с ОДСН и не имевших признаков ИМ, измеряли как стандартный cTnT, так и высокочувствительный hscTnT. Измеряемые уровни cTnT обнаруживались у 56% пациентов, а hscTnT — у 98%. 81% пациентов имел уровни hs cTnT выше 99-й перцентили. Оба теста предсказывали риск смерти (наблюдение в течение 406 дней, медианное значение), при этом значения AUC ROC для cTnT и hscTnT составляли 0,67 против 0,71. Однако у пациентов с cTnT  $< 0,03$  нг/мл, но hs cTnT  $> 20$  пг/мл, был выявлен высокий риск смерти (отношение рисков 4,7). Полагается, что «у пациентов с ОДСН как стандартный, так и высокочувствительный тропонины дают сходную прогностическую информацию, однако у пациентов с низкими уровнями cTnT прогностическую информацию может дать только hscTnT» [57]. В целом, мета-анализ 16 исследований показал, что у пациентов с хронической сердечной недостаточностью повышенные тропонины связаны с повышенным риском смертности, составлявшим 2,85? и с повышенным риском главных неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, составлявшим 2,38 [58].

**Тромбоэмболия легочной артерии.** В проспективном наблюдении 156 нормотензивных пациентов с подтвержденной ТЭЛА было обнаружено, что у них были повышены уровни hscTnT, медианное значение 27,2 пг/мл. 64% пациентов имели hscTnT > или = 14 пг/мл. Неблагоприятные исходы в течение 30 дней более частыми были при повышенных значениях hscTnT, уровни которого для дискриминации между пациентами с неблагоприятным и благоприятным прогнозом составляли 71,7 пг/мл против 26,4 [59]. Аналогичные результаты были получены при наблюдении 55 гипертензивных пациентов с установленной ТЭЛА. Повышенные уровни hscTnT были обнаружены у 27,3%, а повышенные уровни стандартного cTnT — у 10,9% лиц. Пять из шести пациентов с уровнями hscTnT > 30 пг/мл умерли в течение наблюдения (12 месяцев) [60].

**Ренальная патология.** Полагается, что у пациентов со сниженной ренальной функцией (от умеренного снижения до диализа и терминальных стадий) повышение уровней тропонинов не связано со снижением их ренального клиренса [61, 62], однако является показателем риска неблагоприятных исходов [63]. Точный механизм повышения тропонинов при ХБП пока не ясен. Считается, что повышенные при ХБП уровни тропонинов в большей степени вызваны сердечной недостаточностью (повышением массы ЛЖ, дисфункцией ЛЖ, повышенными уровнями NT-проBNP), нежели атеросклерозом и ишемией [64].

**Сахарный диабет.** В исследовании ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) при наблюдении 9661 пациента найдено, что повышенный гликозилированный гемоглобин HbA1c (даже в диапазоне ниже его диагностического уровня для СД) связан с будущим повышением hscTnT, которое обнаруживается через год после повышения HbA1c. При этом такое повышение hscTnT было как у пациентов с СД, так и без СД. Риск повышения hscTnT для лиц с HbA1c от 5,7% до 6,4% составлял 1,26, а для лиц с HbA1c  $\geq$  6,5% — 1,97. Авторы полагают, что «повышенный HbA1c у лиц, не имеющих клинических признаков ССЗ, связан с повышением hscTnT, что свидетельствует о том, что гипергликемия способствует развитию повреждения миокарда еще до своего влияния на развитие клинического атеросклероза» [65].

**hscTn при чрезкожном коронарном вмешательстве.** Многочисленные исследования установили, что повышенные послеоперационные уровни тропонинов связаны с повышенным риском неблагоприятных исходов, включая летальный исход и ИМ. Об этом, в частности, свидетельствует мета-анализ исследований, выполненных с применением стандартных тестов [66]. Мета-анализ исследований, в которых применялись hscTn тесты, показал, что периоперационное повышение тропонина может иметь особенно важное прогностическое значение в тех случаях, когда произошедшие интрапроцедурные осложнения вызвали нарушения кровото-

ка, зарегистрированные с помощью ангиографии [66]. Что касается риска развития ИМ после ЧКВ, то наиболее прогностическими считаются предоперационные уровни hscTn [5]. Так, при наблюдении 2352 пациентов, перенесших плановое или неотложное ЧКВ, было показано, что повышенные предоперационные, но не послеоперационные, уровни тропонинов, прогнозировали долгосрочные неблагоприятные исходы [67]. Сходные результаты были получены и при наблюдении 5847 пациентов, перенесших плановое ЧКВ [68].

**hscTn и некардиальная хирургия.** Многочисленные исследования выявили, что неожиданно высокий процент больных, перенесших некардиальную хирургию, имеет повышенные уровни hscTn, притом как в абсолютных значениях, так и в значениях динамики повышения тропонинов сразу после хирургии. При наблюдении 325 пациентов, перенесших некардиальную хирургию, обнаружилось, что 45% имели повышенные уровни hscTnT, а 22% имели повышение hscTnT более чем на 85% по сравнению с уровнем до операции. Полагается, что такое повышение может быть вызвано стрессом, происходящим как в течение операции, так и после нее, нарушающим баланс снабжения/потребления кислорода [69]. В недавнем исследовании VISION (Vascular Events in Noncardiac Surgery Patients Cohort Evaluation) наблюдали 15 133 пациента, перенесших некардиальную хирургию. Оказалось что повышенный hscTnT (> 20 нг/л) обнаруживался у 11,6% пациентов и был связан с 30-дневной смертностью следующим образом (отношение рисков): 1) при 20 нг/л — 2,41; 2) при 30–290 нг/л — 5,0; 3) при 300 нг/л и выше — 10,48. 30-дневная смертность пациентов с hscTnT = или < 10 нг/л составляла 1,0%, с hscTnT = 20,0 нг/л — 4,0%, при 30–290 нг/л — 9,3% и при более 300 нг/л — 16,9% [70].

#### Как отличать ишемическое повышение hscTn от неишемического: «дельта подход»

Считается твердо установленным, что ишемическое повышение hscTn связано с острым коронарным событием, при этом такое повышение происходит в течение нескольких часов после поступления пациента с признаками ОКС. Неишемическое повышение характеризуется хронически повышенными hscTn и связано со структурными повреждениями миокарда. Серийные измерения hscTn, проводимые при поступлении с подозрением на ОКС, позволяют надежно отличить ишемическое повышение от неишемического. Как часто и с каким интервалом следует проводить серийные измерения? Следует ли проводить серийные измерения hscTn, если при поступлении его уровни нормальные?

**Нормальный уровень hscTn при поступлении с признаками ОКС диагностического значения не имеет.** В специальном исследовании в течение 1 года наблюдался 1181 пациент, поступивший с загрудинной болью. ОКС был диагностирован у 351 пациента (30%), из которых 187 имели ОИМ и 164 — нестабильную сте-

нокардию. При поступлении hscTnT был нормальным (<14 нг/л) у 112 пациентов с ОКС (32%), включавших 11 больных с ОИМ (6%) и 101 пациента с нестабильной стенокардией (62%). С нормальными уровнями hscTnT были связаны: 1) предшествовавшая терапия статинами, 2) сохраненная ренальная функция и 3) отсутствие элевации ST сегмента. Смертность пациентов с нормальными hscTnT составляла: за 30 дней – 0,0%, за 90 дней – 0,0% и за год – 2,0%. У пациентов с повышенным hscTnT смертность за год составляла 17,5%. Количество ИМ у пациентов с нормальным hscTnT было ниже, чем у больных с повышенным hscTnT [71]. Таким образом, *у одной трети больных, поступающих с ОКС (и имеющих преимущественно нестабильную стенокардию), могут быть нормальные уровни тропонинов. Этот вывод был подтвержден в другом проспективном и многоцентровом исследовании, в котором два года наблюдались 2072 пациента, поступивших с острой сердечной болью. При поступлении проводили высокочувствительное измерение тропонинов с помощью четырех различных тест-систем: hs-cTnT Roche; hs-cTnI Siemens; hs-cTnI Beckman Coulter и hs-cTnI Abbott. Диагностированный ОИМ имели: 1) среди 2072 пациентов, которым измерялся hs-cTnT, – 21,4% 2) среди 1180 пациентов, которым измерялся hs-cTnI Siemens, – 20,0%; 3) среди 1151 пациента, которым измерялся hs-cTnI Beckman Coulter, – 19,7% и 4) среди 1151 пациента, которым измерялся hs-cTnI Abbott, – 20,0%. Вывод: «нормальные уровни hscTn при поступлении не должны использоваться как единственный параметр для исключения ОИМ, так как в 6–23% случаев ОИМ уровни hscTn при поступлении были нормальными» [72]. Таким образом, при поступлении с подозрением на ОКС серийные измерения должны проводиться и тогда, когда результат первого измерения нормальный.*

А если при поступлении уровни hscTn такие низкие, что даже не определяются? Действительно, недавно при наблюдении 703 пациентов, поступивших с подозрением на ОКС, было обнаружено, что 28% из них имели уровни hscTnT < 3 нг/л (предел определения). При этом ИМ был диагностирован у 19% из всех пациентов, но ни у од-

ного пациента с недетектируемыми уровнями hscTnT ИМ диагностирован не был, при этом отрицательное предиктивное значение недетектируемых уровней hscTnT по отношению к ИМ составляло 100% [73]. Сходные результаты были получены и при наблюдении 1818 пациентов с подозреваемым ИМ. Неизмеряемые уровни hscTnI (нижний предел определения 3,4 нг/л) имели 27% больных, при этом отрицательное предиктивное значение недетектируемых уровней hscTnT также составляло 100% [74].

Действительно, все эти данные свидетельствуют в пользу того, что для пациентов с недетектируемыми при поступлении уровнями hscTnI серийные измерения не обязательны, тем не менее, текущие международные рекомендации не предусматривают такого алгоритма. Ведь при поступлении с подозрением на ОИМ цена ложноотрицательного результата гораздо выше ложноположительного.

Следующий вопрос: какая дельта лучше? Относительная или абсолютная? Окончательного и однозначного ответа пока нет.

**Относительная дельта.** Какие именно относительные значения дельты (в %) и за какое время (в часах) имеют наибольшую специфичность и чувствительность? В таблице 1 приведены результаты исследований, направленных на решение этой проблемы

Хотя третье всеобщее определение ИМ и требует определения динамики концентрации тропонинов, оно не устанавливает ее количественных критериев. Однако группа экспертов, принимавших участие в его подготовке, в отдельной статье рекомендует оценку относительных значений динамики hscTn: 1) при поступлении, 2) через 3 ч и 3) в случае неясной картины, по решению врача – через 6 ч [79] (рис. 5). Непременное условие – чтобы значение повышения уровня тропонинов было достоверным, коэффициент вариации (разброс измерений) должен быть не более 10%.

Особо подчеркнем, что *если при поступлении с признаками ОКС первое измерение даст результат ниже пограничного (> 99-я перцентиль × 2), тем не менее, серийные измерения следует проводить и в этом случае,*

Таблица 1. Чувствительность и специфичность относительной дельты [14]

Исследование	Дельта за ч	Специфичность	Чувствительность
Aldous S. et al. [75]	≥10% за 2 ч	69%	89,7%
Aldous S. et al. [75]	≥ 20% за 2 ч	56,1%	92,6%
Keller T. et al. [74]	≥ 250% за 3 ч	32,6%	99,6%
Giannitsis E. et al. [76]	≥ 117% за 3 ч	69–76%	100%
Eggers et al. [77]	≥20% за 6 ч	84%	Нет данных
Apple et al. [78]	≥ 30% за 6 ч	75%	90,6%



Рис. 5. Алгоритм серийных измерений hscTn [79]. Подробности в тексте

чтобы надежно выявить или исключить развивающийся ИМ. Отметим, что основные производители высокочувствительных тропониновых тестов рекомендуют собственные алгоритмы серийных измерений, предусматривающие определение относительных значений дельты.

**Абсолютная дельта.** Результаты исследований, посвященных диагностическим характеристикам, приведены в таблице 2

Однако, если считать диагностическими только высокие численные значения относительной и абсолютной дельты, это может снизить чувствительность выявления ИМ, которые могут происходить и при более малых повышениях тропонинов. Другая стратегия ранней диагностики ИМ может быть направлена не на выявление значений hscTn, превышающих диагностический порог,

а на динамику hscTn в диапазоне низких концентраций, не дожидаясь, когда эти концентрации повысятся. Предполагается, что оптимальные алгоритмы и конкретные значения абсолютной и относительной дельты могут быть разными в отделении неотложной помощи в амбулатории. В отделении неотложной помощи, куда поступают пациенты с подозрением на ОКС, целесообразны высокая чувствительность и высокие отрицательные предиктивные значения. Для амбулаторных пациентов важны высокая специфичность и высокие положительные предиктивные значения [14, 82, 83].

#### Интерпретация повышения высокочувствительных тропонинов

Текущие рекомендации по интерпретации повышенных уровней hscTn представлены на рисунке 6 [10].

Таблица 2. Чувствительность и специфичность относительной дельты [14]

Исследование	Дельта	Чувствительность	Специфичность	ОПЗ	ППЗ
Mueller M. et al [80]	9,2 нг/л	89,7%	74,8%	96,5%	48,7%
Reichlin T. et al [81]	7 нг/л	89%	93%	98%	64%

ОПЗ – отрицательное предиктивное значение; ППЗ – положительное предиктивное значение.



Рис. 6. Рекомендации по интерпретации высокочувствительного измерения кардиальных тропонинов при поступлении с подозрением на ИМ [10]

### Следует ли измерять hscTn для скрининга кардиальных патологий в общей популяции и у амбулаторных пациентов?

Как отмечалось, неишемически повышенные уровни hscTn связаны с риском неблагоприятных исходов, и притом более сильно, чем ишемически повышенные hscTn. Насколько оправданным будет измерение hscTn для скрининга? С какой частотой в общей популяции встречаются индивиды с уровнями hscTn выше нижнего предела определения? Для ответа на этот вопрос были проведены три исследования, в которых, в целом, было обследовано более 17 500 лиц [40, 51, 84].

**Общая популяция.** Так, в исследовании Dallas Heart Study (общая популяция, возраст 30–65 лет) таких индивидов было выявлено 25% [51]. В исследовании ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities), общая популяция, возраст 54–74 года, — 65% [84]. В исследовании CHS (Cardiovascular Health Study), общая популяция, возраст от 65 лет и выше, — 66,5% [40]. В общем, установлено, что уровни hscTn(1) повышаются с возрастом, 2) у мужчин они выше, чем у женщин, 3) повышены при ХБП, 4) связаны с патологическим ремоделированием миокарда, 5) возрастают параллельно с наличием и тяжестью гипертрофии ЛЖ и 6) систолической дисфункции ЛЖ [51].

Существенно, что предшествовавшие ИМ, стенокардия и коронарный кальций не были связаны с детекти-

руемыми уровнями hscTn. Однако в каждом из проведенных популяционных исследований повышенный hscTn был связан: 1) со смертностью от всех причин, 2) с кардиоваскулярной смертностью, 3) со случаями сердечной недостаточности и, что существенно, эта связь сохранялась после поправок на традиционные факторы риска, такие как ренальная дисфункция, концентрации NT-проBNP и высокочувствительного С-реактивного белка [40, 51, 84, 85].

В недавнем исследовании Framingham Offspring Study, в котором наблюдались 3428 лиц (средний возраст 59 лет), было обнаружено, что количество лиц с детектируемыми уровнями hscTnI составило 81%, при этом хронически повышенные уровни hscTnI были связаны с повышенным риском смертности и сердечной недостаточности, но не с риском ИМ (наблюдение 11,3 года) [86].

**Стабильные заболевания коронарных артерий, сердечная недостаточность.** Действительно, почти у 100% амбулаторных пациентов со стабильными заболеваниями коронарных артерий или с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) уровни hscTn повышены и связаны с повышением риска повторной госпитализации и смертности. Это было обнаружено при исследовании 4053 пациентов с ХСН [87]. При наблюдении в течение 5,2 года 3679 пациентов со стабильными заболеваниями коронарных артерий и сохраненной функцией ЛЖ уровни hscTnT выше нижнего предела опре-

деления обнаружены у 97,7% пациентов, а выше 99-й процентиля — у 11,1%. После поправок на другие прогностические показатели обнаружилась сильная связь между натуральным логарифмом уровней hscTnT и неблагоприятными исходами (повторная госпитализация, смерть, но не ИМ) как у индивидов с уровнями ниже 99-й процентиля, так и у лиц с hscTnT выше таковой [88]. В недавнем исследовании наблюдались 3623 пациента со стабильными заболеваниями коронарных артерий, принимавших ингибитор ангиотензин-превращающего фермента. У 98,5% уровни hscTnI были выше нижнего предела определения. В течение 5,2 года: 203 пациента были повторно госпитализированы или умерли от сердечно-сосудистых причин, 209 пациентов перенесли нефатальные ИМ. Оказалось, что повышенные уровни hscTnI (в четвертой квартили по сравнению с третьей) были связаны с сердечно-сосудистой смертностью и повторной госпитализацией, отношение рисков — 1,88. Авторы считают, что *«у пациентов со стабильными заболеваниями коронарных артерий повышение уровней hscTnI связано с кардиоваскулярным риском независимо от традиционных маркеров риска»* [89].

В другом исследовании уровни hscTnT измерялись у 984 амбулаторных пациентов со стабильными заболеваниями коронарных артерий, у 80,7% были обнаружены детектируемые уровни hscTnT, при этом пациентам проводилось стресс-тестирование (бегущая дорожка, эхокардиография). Исходно повышенные уровни hscTnT, как выяснилось, были связаны: 1) с большей тяжестью индуцируемой ишемии, 2) более тяжелыми изменениями фракции выброса ЛЖ, 3) с нарушением функции левого предсердия, 4) диастолической дисфункцией, 5) массой ЛЖ и 6) со снижением способности к выполнению теста на бегущей дорожке. В течение периода наблюдения (8,2 года; медианное значение) 32,2% пациентов перенесли сердечно-сосудистые события. После необходимых поправок на традиционные факторы риска и на уровни NT-proBNP и hsCRP обнаружилось, что *каждое удвоение уровня hscTnT повышало риск сердечно-сосудистых событий на 37%*. Авторы заключили, что *«у амбулаторных пациентов со стабильными заболеваниями коронарных артерий повышенные уровни hscTnT связаны с множественными нарушениями структуры и функций миокарда и являются предикторами вторичных коронарных событий»*. Авторы полагают, что их данные свидетельствуют о том, что *«уровни hscTnT могут выявлять те элементы риска, которые не определяются существующими методами определения тяжести коронарных заболеваний»* [90].

Так следует ли hscTn использовать для скрининга в общей популяции и для оценки кардиорисков у амбулаторных пациентов? Вот что показало специальное исследование. У 1004 индивидов (возраст от 70 лет и старше) hscTnI измеряли в начале наблюдения и через 5 лет (у 814 лиц). У большинства пациентов медианные уровни hscTnI за 5 лет возросли на 45% и были связаны:

1) с мужским полом, 2) индексом массы тела, 3) сниженным уровнем ЛПВП, 4) повышенным NT-proBNP, 5) с фракцией выброса ЛЖ, и, независимо от других факторов риска, предсказывали общую смертность; отношение рисков — 1,97. Авторы полагают, что *«у пожилых лиц уровни hscTnI со временем повышаются, что является сильным маркером риска смертности»*. По мнению авторов, их данные позволяют считать, что *«hscTnI может быть использован для клинической оценки индивидов в общей популяции»* [91].

Следует учесть, однако, что если лица с хронически повышенными hscTn и амбулаторные пациенты будут при рутинной практике направляться на кардиологическую консультацию и/или на дополнительную диагностику, затраты и потенциальный вред, нанесенные потенциально излишним тестированием, могут быть существенными. Полагается, что проблемы интерпретации и реализации результатов неишемического повышения hscTn, а также возросшие затраты, с этим связанные, и сопутствующие этому тревога и опасения пациентов и клиницистов, в целом, при работе с hscTn тестами могут быть выше, чем при работе со стандартными сTn тестами [14]. Недаром один из недавних обзоров так и озаглавлен: *«Высокочувствительные тропонины — трудные друзья острых коронарных синдромов»* [92].

#### **Проблемы терапии при ишемически и неишемически повышенных высокочувствительных тропонинах**

Должна ли терапия при повышенных hscTn быть такой же, как при повышенных стандартных тропониновых тестах и такой же, как при повышенной КК МБ? Действительно, есть данные, что повышение различных кардиомаркеров отражает различные патофизиологические нарушения миокарда и, тем самым, предопределяет различные стратегии их терапии. В ранних многоцентровых исследованиях (стандартный тропонин) было показано, что «сTn положительные» и «КК МБ отрицательные» пациенты с ИМБСТ имеют такой же риск неблагоприятных исходов, как и пациенты с ИМБСТ, но «КК МБ положительные». Более того, оказалось, что агрессивная терапия «сTn положительных пациентов с ИМ Б СТ» с помощью антагонистов гликопротеина IIb/IIIa или с помощью проведения раннего ЧКВ улучшает их исходы, однако «сTn отрицательные пациенты» с ОКС пользу от такой стратегии не получали [93, 94]. Данные этих исследований были подтверждены с помощью имаджинга, который выявил сильную связь между образованием тромбов в местах нестабильных повреждений и скоростью повышения стандартного сTnT. Это привело к представлению, что повышенный сTn — это маркер комплексного повреждения артерий и последующей микроэмболизации [95]. Ранние исследования пациентов с ОКС с применением стандартных сTn тестов показали, что пациенты даже с малыми повышениями сTn получают пользу от раннего инвазивного вмешательства [93].

**Ишемическое повышение.** Существующие согласованные рекомендации по терапии ИМ типа 1 и ИМ типа 2 [82, 96], к сожалению, не дают информации о наилучших стратегиях по терапии ИМ типа 2, который вызывается нарушением баланса между поступлением и потреблением кислорода в отсутствие разрыва бляшек.

Индивидуализированный подход к терапии ИМ обычно направлен на терапию патологических состояний, связанных с ИМ 2. Он включает снижение дисбаланса между потребностью и поступлением кислорода. В частности, с помощью приемов, включающих бета-блокаторы, следует контролировать гипертензию и тахикардию. При наличии тяжелой анемии следует провести ее коррекцию. Также, если нет противопоказаний, может быть рекомендован аспирин. Для пациентов с повторной ишемией применение антикоагулянтов и инвазивной терапии должно проводиться после терапии патологии, связанной с нарушением баланса потребления/снабжения кислородом. Однако эффективность этих стратегий для пациентов с ИМ 2 в рандомизированных и контролируемых исследованиях еще не показана [5, 10].

Данных об эффективности раннего инвазивного вмешательства при повышении hscTn пока нет. Однако в исследовании Platelet Inhibition and Patient Outcomes (PLATO) было показано, что у 5011 пациентов, у которых при поступлении был повышен hscTnT > 99-й перцентили и перенесших инвазивное вмешательство, терапия с помощью тикагрелора (антитромбоцитарный препарат) снижала неблагоприятные исходы (смерть, ИМ, инсульт) с 11,2% до 8,5%. У 3576 пациентов, которым инвазивное вмешательство назначено не было, тикагрелор снизил неблагоприятные исходы (в большинстве случаев летальность) с 14,9% до 12,4% (наблюдение 6–12 месяцев). При этом у пациентов с ИМБСТ и с нормальным hscTnT и не назначенных на инвазивное вмешательство количество неблагоприятных исходов было очень низким. Авторы сделали вывод: «у пациентов с ИМБСТ и повышенным hscTnT тикагрелор повышает выживаемость, снижает кардиоваскулярную смертность, количество спонтанных ИМ и ИМ, связанных с инвазивным вмешательством, и также у пациентов, которым инвазивное вмешательство, не назначалось, снижает общую смертность и спонтанные ИМ» [97]. Существенно, что у 1361 пациента, поступившего с нестабильной стенокардией, положительного эффекта от тикагрелора и клопидогреля не было [98].

Весьма принципиальны данные о том, что у пациентов, перенесших ОКС и имевших при поступлении высокие уровни hscTnT, дарапладиб снижал уровни hscTnI, измеряемые в течение 1 года после острого коронарного события [99]. Дарапладиб — ингибитор активности липопротеин-ассоциированной фосфолипазы А2 (ЛП-ФЛА2). Синтез ЛП-ФЛА2, происходящий внутри бляшек, связан с повышением риска их разрыва и последующего тромбообразования. Чем выше уровень

ЛП-ФЛА2 — тем выше риск ИМ и ишемических инсультов [см. обзоры 100, 101]. В специальном исследовании эффективности дарапладиба у 323 пациентов, 161 с ОКС и 162 без ОКС, уровни hscTnI измерялись при поступлении и через 4, 13, 26 и 52 недели. У пациентов с ОКС уровни hscTnI были повышены в течение длительного времени, включая и тот период, когда острая ишемия уже не обнаруживалась и больные характеризовались как имеющие стабильные заболевания коронарных артерий, при этом средние уровни hscTnI составляли 1,180 нг/л против 0,886 нг/л у лиц без ОКС. Терапия с помощью дарапладиба была связана с менее частым двукратным повышением hscTnT в течение периода наблюдения, отношение рисков составляло 0,219. Авторы считают, что «у пациентов с ОКС терапия с помощью дарапладиба (по сравнению со стандартной терапией) связана со снижением уровней hscTnI. Такой благоприятный эффект может быть связан со способностью дарапладиба уменьшать некротическое ядро в бляшках коронарных артерий» [99].

Отметим, что при терапии в течение восьми недель 78 гипертензивных пациентов, принимавших амолдипин или лозартан + гидрохлоротиазид (в одинаковой мере снижающие кровяное давление в течение 24 ч), обнаружилось, что уровни hscTnT снижались в группе, принимавшей амолдипин, но не в группе, принимавшей лозартан + гидрохлоротиазид [102].

**Неишемическое повышение.** Конкретных рекомендаций по терапии пациентов с неишемическим повышением hscTn пока нет. Поскольку такое повышение связано с весьма неблагоприятным прогнозом, следует принимать все меры, чтобы установить его причины. Алгоритм выяснения причин(ы) неишемического повышения hscTn должен включать: детальное изучение истории болезни, клиническое обследование, оценку ренальной функции, анализ ЭКГ. Принимая во внимание сильную связь между повышенным hscTn и структурными и функциональными аномалиями миокарда, именно картина ЭКГ должна рассматриваться как наиболее существенная возможность для выявления наиболее неясных причин неишемического повышения тропонина. Однако данных о том, что выполнение ЭКГ для всех пациентов с хронически повышенными уровнями hscTn действительно улучшает их исходы, пока нет.

В целом, после детального обследования вся информация должна быть обобщена и проанализирована, насколько она соответствует признакам: 1) ИМ типа 1, 2) ИМ типа 2, 3) острому событию, не связанному с ОКС, и 4) хроническому состоянию, не связанному с ОКС. Полагается, что при этом необходимо корректировать те патологии, с которыми связано неишемическое повышение hscTn. При этом должны быть предприняты усилия, направленные на внедрение разумной стратегии, которая минимизировала бы излишнюю терапию и напрасные затраты [5, 10, 83].

Итак, что уже дали на практике высокочувствительные тропонины? Разработаны они были для выявления самых ранних стадий развития мионекроза и для самой ранней диагностики ИМ, связанных с развитием ишемии. Действительно, внедрение этих тестов приводит к выявлению большего количества ИМ, в особенности ИМБСТ, чем диагностика, основанная на стандартных тропониновых тестах. Значительная часть диагнозов, которые ранее неправомерно считались нестабильной стенокардией, с помощью высокочувствительных тропонинов реклассифицируется как ИМБСТ. Это, собственно, и есть ожидаемый результат высокочувствительных измерений тропонинов.

Неожиданный — большая часть пациентов, поступающих с подозрением на ОКС, имеют повышенные уровни hscTn, вызванные неишемическими причинами, и не могут быть диагностированы как ИМ.

Примерно 75% лиц, поступающих с подозрением на ОКС (рис. 2), вообще не имеют повышенных уровней hscTn. Из оставшихся 25% с повышенными hscTn — примерно половина имеют ишемическое повышение тропонинов, а другая половина — неишемическое. Более того, при равной степени повышения hscTn риск неблагоприятных исходов у пациентов с неишемическим повышением hscTn почти в два раза выше, чем при ишемическом (рис. 3).

Таким образом, оказалось, что высокочувствительные тропонины превзошли ожидания, связанные с их разработкой. Кроме выявления большего количества пациентов с ИМБСТ, они выявляют еще большее количество лиц с неишемическими структурными повреждениями миокарда, имеющими риск смертности, в два раза превышающий таковой у лиц с ишемическими повышенными высокочувствительными тропонинами.

В целом, высокочувствительные тропонины могут использоваться для: 1) ранней диагностики ИМ, в особенности — ИМБСТ, 2) выявления неишемических структурных повреждений миокарда различной этиологии и 3) для стратификации связанных с ними рисков неблагоприятных исходов.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

**Диагностические критерии инфарктов миокарда согласно третьему всеобщему определению [4]**

**ИМ типов 1 и 2 — «выявление повышения и/или снижения концентрации кардиомаркера [предпочтительно кардиального тропонина (сTn)], по крайней мере, на одно значение 99-й перцентили, соответствующее верхней границе референтного уровня», т.е. «≥ 99-я перцентиль × 2».** Дополнительно должен иметь место, по крайней мере, один из пяти подтверждающих признаков ИМ: 1) симптомы ишемии; 2) новое (или предположительно новое) значительное изменение сегмента ST и зубца T, или блокада левой ножки пучка Гиса; 3) появление патологического зубца Q; 4) дополнительная гибель миокарда или региональное нарушение подвиж-

ности миокарда, доказанные путем визуализации (имаджинга); 5) обнаружение внутрикоронарного тромба при ангиографии или на аутопсии.

**ИМ, связанный с ЧКВ (тип 4a),** диагностируется: у пациентов с нормальным исходным уровнем сTn — при превышении уровня 99-й перцентили в течение 48 ч после процедуры в *пять раз* ( $> 99\text{-я перцентиль} \times 5$ ); у пациентов с исходно повышенным сTn (стабильным или снижающимся) — при повышении исходного уровня сTn более чем на 20% *при дополнительном наличии*, по крайней мере, одного из следующих признаков, включающих: 1) симптомы миокардиальной ишемии, 2) вновь появившиеся признаки ишемии на ЭКГ, 3) осложнения, связанные с чрескожной процедурой (по результатам ангиографии), 4) гибель дополнительной части миокарда или региональное нарушение подвижности миокарда, доказанные путем визуализации (имаджинга).

**ИМ, связанный с тромбозом стента (тип 4b),** диагностируется с помощью коронарной ангиографии или на аутопсии при наличии миокардиальной ишемии и при по крайней мере двукратном превышении 99-й перцентили уровня сTn ( $> 99\text{-я перцентиль} \times 2$ ).

**ИМ, связанный с рестенозом после ЧКВ (тип 4c),** диагностируется: при наличии  $\geq 50\%$  стенозов при коронарной ангиографии, либо как комплексное поражение, ассоциированное с ростом и/или падением уровня сTn  $> 99\text{-й перцентили}$  *при отсутствии* значительной обструкции коронарных артерий после: а) первоначально удачной постановки стента, или б) баллонной ангиопластики стенозированной коронарной артерии ( $< 50\%$ ).

**ИМ, связанный с АКШ (тип 5),** у пациентов с нормальным исходным сTn диагностируется при повышении в течение 48 ч после операции уровня сTn, превышающего 99-ю перцентиль в *десять раз* ( $> 99\text{-я перцентиль} \times 10$ ) *при одновременном наличии*, по крайней мере, одного из дополнительных критериев, включающих: 1) появление патологического зубца Q или блокады левой ножки пучка Гиса, 2) ангиографически подтвержденную окклюзию нового шунта или исходной коронарной артерии, 3) гибель участка миокарда или региональное нарушение подвижности миокарда, доказанное путем визуализации (имаджинга).

**Реинфаркт** — это ОИМ, развившийся в течение 28 дней после первого или повторного эпизода ИМ. Рекомендуется серийное измерение hscTn, повышение его уровня  $\geq 20\%$  подтверждает развитие реинфаркта.

**Повторный ИМ** — это появление признаков ИМ более чем через 28 дней, прошедших после первого ИМ. Дифференциация реинфаркта и повторного ИМ важна для обработки результатов проспективных исследований, устанавливающих риски различных неблагоприятных исходов. У пациентов с подозреваемым повторным ИМ рекомендуется немедленное измерение тропонина, повторное — через 3–6 ч. Если исходный тропонин нормальный — для диагностики повторного ИМ рекомен-

дуются те же критерии, что и для диагностики ИМ типов 1 и 2. Если при подозрении на повторный ИМ исходный тропонин повышен, дальнейшее повышение его уровня на 20% подтверждает диагноз ИМ.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

### Показания к назначению высокочувствительного измерения кардиальных тропонинов [5]

Поскольку повышенный тропонин не является строго специфическим для ИМ, его измерение следует проводить при наличии клинических указаний на подозреваемый ИМ.

Наивысший приоритет имеет назначение высокочувствительного измерения для диагностики ИМ при симптомах, указывающих на ишемию, и при недиагностической картине ЭКГ.

Тропонин также рекомендуется измерять: 1) для диагностики ИМ у пациентов с ХПН, имеющих симптомы ИМ (независимо от тяжести ренальных нарушений); 2) для стратификации риска у пациентов с сердечной недостаточностью, 3) для прогнозирования состояния пациентов, имеющих ХБП, 4) для оценки состояния пациентов, находящихся на химиотерапии и уже имеющих повреждения миокарда, вызванные фармпрепаратами.

Автор благодарит к.б.н. Соловьеву И.В. (ЗАО «ДИАКОН») за помощь в работе над текстом.

## Литература

1. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology / World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature // *Circulation*. 1979; 59: 607–9.
2. Вельков В.В. Третье всеобщее определение инфаркта миокарда: решающее значение высокочувствительных тропонинов // *Клинико-лабораторный консилиум*. 2013, в печати. Электронная версия: <http://www.diakonlab.ru/files/Docs/SciArticles/hsVelkovVV.pdf> (Последний доступ 10.08.2013)
3. Вельков В.В. Новые международные критерии инфаркта миокарда и высокочувствительные тропонины: новые возможности и новые проблемы // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013, направлено в печать. Электронная версия: <http://www.diakonlab.ru/files/Docs/SciArticles/NewInternationalCriteriaVVV3.pdf> (Последний доступ 10.08.2013)
4. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S. et al. Third Universal Definition of Myocardial Infarction // *Circulation*. 2012; 126 (16): 2020–35. Электронная версия: <http://circ.ahajournals.org/content/126/16/2020.full.pdf+html>
5. Newby L.K., Jesse R.L., Babb J.D. et al. ACCF 2012 expert consensus document on practical clinical considerations in the interpretation of troponin elevations: a report of the American College of Cardiology Foundation task force on Clinical Expert Consensus Documents // *J. Am. Coll. Cardiol*. 2012; 11; 60 (23): 2427–63.
6. Mueller M., Vafaei M., Biener M. Cardiac troponin T // *Circ. J*. 2013; 77 (7): 1653–61.
7. Costa F.M., Ferreira J., Aguiar C. et al. Impact of ESC/ACCF/AHA/WHF universal definition of myocardial infarction on mortality at 10 years // *Eur. Heart J*. 2012; 33 (20): 2544–50.
8. Mills N.L., Churchhouse A.M., Lee K.K. et al. Implementation of a sensitive troponin I assay and risk of recurrent myocardial infarction and death in patients with suspected acute coronary syndrome // *JAMA*. 2011; 305 (12): 1210–6.
9. Mills N.L., Lee K.K., McAllister D.A. et al. Implications of lowering threshold of plasma troponin concentration in diagnosis of myocardial infarction: cohort study // *BMJ*. 2012; 344: 1533–44.
10. de Lemos J.A. Increasingly Sensitive Assays for Cardiac Troponins // *JAMA*. 2013; 309 (21): 2262–2269.
11. Вельков В.В. Революция в кардиологии; высокочувствительное измерение кардиальных тропонинов: «тропонин-отрицательных больше нет» // *Клинико-лабораторный консилиум*. 2011; 4 (40): 24–43. Электронная версия: [http://www.diakonlab.ru/files/Docs/SciArticles/Issue4\(40\)2011\\_\(24-43\).pdf](http://www.diakonlab.ru/files/Docs/SciArticles/Issue4(40)2011_(24-43).pdf). (Последний доступ 10.08.2013)
12. Lippi G., Montagnana M., Aloe R., Cervellin G. High sensitive troponin immunoassays: navigating between the scylla and charybdis // *Adv. Clin. Chem*. 2012; 58: 1–29.
13. Вельков В.В. Высокочувствительное измерение кардиальных тропонинов: тест, который спасает жизни // *Клинико-лабораторный консилиум*. 2012; 1 (41): 47–52. Электронная версия: [http://www.diakonlab.ru/files/Docs/SciArticles/MagN1\\_41\\_\(1-47-52\).pdf](http://www.diakonlab.ru/files/Docs/SciArticles/MagN1_41_(1-47-52).pdf). (Последний доступ 10.08.2013)
14. Marini M.G., Cardillo M.T., Caroli A. Increasing specificity of high-sensitivity troponin: New approaches and perspectives in the diagnosis of acute coronary syndromes // *J. Cardiol*. 2013; Jun 17.
15. Hickman P.E., Potter J.M., Aroney C., Koerbin G., Southcott E., Wu A.H. et al. Cardiac troponin may be released by ischemia alone, without necrosis // *Clin. Chim. Acta*. 2010; 411: 318–23.
16. Jaffe A.S., Wu A.H.B. Troponin Release – Reversible or Irreversible Injury? Should We Care? // *Clinical Chemistry*. 2012; 58: 1148–150.
17. Mingels A., Jacobs L., Michielsen E., Swaanenburg J., Wodzig W., van Dieijen-Visser M. Reference population and marathon runner sera assessed by highly sensitive cardiac troponin T and commercial cardiac troponin T and I assays // *Clin. Chem*. 2009; 55 (1): 101–108.
18. Scherr J., Braun S., Schuster T., Hartmann C., Moehlenkamp S., Wolfarth B. et al. 72-h kinetics of high-sensitivity troponin T and inflammatory markers after marathon // *Med. Sci. Sports Exerc*. 2011; 43: 1819–27.
19. Sabatine M.S., Morrow D.A., de Lemos J.A. et al. Detection of acute changes in circulating troponin in the setting of transient stress test-induced myocardial ischaemia using an ultrasensitive assay: results from TIMI 35 // *Eur. Heart J*. 2009; 30 (2): 162–9.
20. Katus H.A., Remppis A., Scheffold T., Diederich K.W., Kuebler W. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction // *Am. J. Cardiol*. 1991; 67: 1360–1367.
21. Remppis A., Scheffold T., Greten J. et al. Intracellular compartmentation of troponin T: release kinetics after global ischemia and calcium paradox in the isolated perfused rat heart // *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1995; 27 (2): 793–803.
22. Schlett C.L., Truong Q.A., Ahmed W. et al. High-sensitivity troponin T and C-reactive protein to identify patients without cardiac structural and functional abnormalities as assessed by cardiac CT and SPECT imaging: can biomarkers predict cardiac health? // *Int. J. Cardiovasc. Imaging*. 2013; 29 (4): 865–73.

23. Ahmed W., Schlett C.L., Uthamalingam S. et al. Single Resting hsTnT Level Predicts Abnormal Myocardial Stress Test in Acute Chest Pain Patients With Normal Initial Standard Troponin // JACC Cardiovasc. Imaging. 2013; 6 (1): 72–82.
24. Katrukha A.G., Bereznikova A.V., Esakova T.V. et al. Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex // Clin. Chem. 1997; 43: 1379–85.
25. Labugger R., Organ L., Collier C. et al. Extensive troponin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction // Circulation. 2000; 102 (11): 1221–6.
26. McDonough J.L., Van Eyk J.E. Developing the next generation of cardiac markers: disease-induced modifications of troponin I // Prog. Cardiovasc. Dis. 2004; 47 (3): 207–16.
27. Gaze D.C., Collinson P.O. Multiple molecular forms of circulating cardiac troponin: analytical and clinical significance // Ann. Clin. Biochem. 2008; 45 (Pt. 4): 349–55.
28. Labugger R., Organ L., Collier C. et al. Extensive troponin I and T modification detected in serum from patients with acute myocardial infarction // Circulation. 2000; 102 (11): 1221–6.
29. Kim W.J., Laterza O.F., Hock K.G. et al. Performance of a revised cardiac troponin method that minimizes interferences from heterophilic antibodies // Clin. Chem. 2002; 48: 1028–34.
30. Eriksson S., Halenius H., Pulkki K. et al. Negative interference in cardiac troponin I immunoassays by circulating troponin autoantibodies // Clin. Chem. 2005; 51: 839–47.
31. Apple F.S. Standardization of Cardiac Troponin I Assays Will Not Occur in My Lifetime // Clin. Chem. 2012; 58: 169–171.
32. Apple F.S. A new season for cardiac troponin assays: it's time to keep a scorecard // Clin. Chem. 2009; 55: 1303–1306.
33. Giannitsis E., Kurz K., Hallermayer K., Jarausch J., Jaffe A.S., Katus H.A. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay // Clin. Chem. 2010; 56: 254–61.
34. Collinson P.O., Heung Y.M., Gaze D., Boa F., Roxy Senior, Christenson R., Apple F.S. Influence of population selection on the 99th percentile reference value for cardiac troponin assays // Clin. Chem. 2012; 58: 219–25.
35. Zethelius B., Johnston N., Venge P. Troponin I as a predictor of coronary heart disease and mortality in 70-year-old men: a community-based cohort study // Circulation. 2006; 113: 1071–8.
36. Eggers K.M., Lind L., Ahlström H., Bjerntoft T., Ebeling Barbier C., Larsson A., Venge P., Lindahl B. Prevalence and pathophysiological mechanisms of elevated cardiac troponin I levels in a population-based sample of elderly subjects // Eur. Heart J. 2008; 29: 2252–8.
37. Reiter M., Twerenbold R., Reichlin T., Haaf P., Peter F., Meissner J., Hochholzer W., Stelzig C., Freese M., Heinisch C., Breidhardt T., Freidank H., Winkler K., Campodarve I., Gea J. et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction in the elderly using more sensitive cardiac troponin assays // Eur. Heart J. 2011; 32: 1379–89.
38. Olivieri F., Galeazzi R., Giavarina D., Testa R., Abbatecola A.M., Ceka A., Tamburrini P., Busco F., Lazzarini R., Monti D., Franceschi C., Procopio A.D., Antonicelli R. Aged-related increase of high sensitive troponin T and its implication in acute myocardial infarction diagnosis of elderly patients // Mech. Ageing Dev. 2012; 133: 300–5.
39. Normann J., Mueller M., Biener M., Vafaie M., Katus H.A., Giannitsis E. Effect of older age on diagnostic and prognostic performance of high-sensitivity troponin T in patients presenting to an emergency department // Am. Heart J. 2012; 164: 698–705.
40. de Filippi C.R., de Lemos J.A., Christenson R.H. et al. Association of serial measures of cardiac troponin T using a sensitive assay with incident heart failure and cardiovascular mortality in older adults // JAMA. 2010; 304 (22): 2494–2502.
41. Jeremias A., Gibson C.M. Narrative review: alternative causes for elevated cardiac troponin levels when acute coronary syndromes are excluded // Ann. Intern. Med. 2005; 142 (9): 786–791.
42. Javed U., Aftab W., Ambrose J.A. et al. Frequency of elevated troponin I and diagnosis of acute myocardial infarction // Am. J. Cardiol. 2009; 104: 9–13.
43. Januzzi J.L. Jr., Bamberg F., Lee H. et al. High sensitivity troponin T concentrations in acute chest pain patients evaluated with cardiac computed tomography // Circulation. 2010; 121 (10): 1227–1234.
44. Irfan A., Twerenbold R., Reiter M. et al. Determinants of high-sensitivity troponin T among patients with a noncardiac cause of chest pain // Am. J. Med. 2012; 125 (5): 491–498.
45. McFalls E.O., Larsen G., Johnson G., Apple F.S., Goldman S., Arai A. et al. Long-term outcomes of hospitalized patients with a non-acute syndrome diagnosis and an elevated cardiac troponin level // Am. J. Med. 2011; 124: 630–635.
46. Alcalai R., Planer D., Culhaoglu A. et al. Acute coronary syndrome vs nonspecific troponin elevation: clinical predictors and survival analysis // Arch. Intern. Med. 2007; 167 (3): 276–281.
47. Venge P., James S., Jansson L. et al. Clinical performance of two highly sensitive cardiac troponin I assays // Clin. Chem. 2009; 55: 109–116.
48. Bonaca M., Scirica B., Sabatine M. et al. Prospective evaluation of the prognostic implications of improved assay performance with a sensitive assay for cardiac troponin I // J. Am. Coll. Cardiol. 2010; 55: 2118–2124.
49. Celik S., Giannitsis E., Wollert K.C. et al. Cardiac troponin T concentrations above the 99th percentile value as measured by a new high-sensitivity assay predict long-term prognosis in patients with acute coronary syndromes undergoing routine early invasive strategy // Clin. Res. Cardiol. 2011; 100: 1077–1085.
50. Korosoglou G., Lehrke S., Mueller D. et al. Determinants of troponin release in patients with stable coronary artery disease: Insights from CT angiography characteristics of atherosclerotic plaque // Heart. 2011; 97: 823–831.
51. De Lemos J.A., Drazner M.H., Omland T., Ayers C.R., Khera A., Rohatgi A. et al. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population // JAMA. 2010; 304: 2503–2512.
52. Omland T., Pfeiffer M.A., Solomon S.D. et al. Prognostic value of cardiac troponin I measured with a highly sensitive assay in patients with stable coronary artery disease // J. Am. Coll. Cardiol. 2013; 61 (12): 1240–9.
53. Nadir M.A., Rekhraj S., Wei L. et al. Improving primary prevention of cardiovascular events by using biomarkers to identify individuals with silent heart disease // J. Am. Coll. Cardiol. 2012; 60: 960–8.
54. Shah A.S., Langrish J.P., Li X., Jiang L. et al. Cardiac troponin reflects silent myocardial ischemia in patients with stable coronary artery disease // J. Am. Coll. Cardiol. 2012; 59: E1415.
55. Masson S., Latini R., Mureddu G.F. et al. High-sensitivity cardiac troponin T for detection of subtle abnormalities of cardiac phenotype in a general population of elderly individuals // J. Intern. Med. 2013; 273 (3): 306–17.
56. Januzzi J.L. Jr., Filippatos G., Nieminen M. et al. Troponin elevation in patients with heart failure: on behalf of the third Universal

Definition of Myocardial Infarction Global Task Force: Heart Failure Section // *Eur. Heart J.* 2012; 33 (18): 2265–71.

57. Pascual-Figal D.A., Casas T., Ordonez-Llanos J. et al. Highly sensitive troponin T for risk stratification of acutely destabilized heart failure // *Am. Heart J.* 2012; 163 (6): 1002–10.

58. Nagarajan V., Hernandez A.V., Tang W.H. Prognostic value of cardiac troponin in chronic stable heart failure: a systematic review // *Heart.* 2012; 98 (24): 1778–86.

59. Lankeit M., Friesen D., Aschoff J. et al. Highly sensitive troponin T assay in normotensive patients with acute pulmonary embolism // *Eur. Heart J.* 2010; 31: 1836–1844.

60. Filusch A., Giannitsis E., Katus H.A. et al. High-sensitive troponin T: A novel biomarker for prognosis and disease severity in patients with pulmonary arterial hypertension // *Clin. Sci. (Lond.)* 2010; 119: 207–213.

61. Kanderian A.S., Francis G.S. Cardiac troponins and chronic kidney disease // *Kidney Int.* 2006; 69: 1112–4.

62. Wang A.Y., Lai K.N. Use of cardiac biomarkers in end-stage renal disease // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 19: 1643–52.

63. Khan N.A., Hemmelgarn B.R., Tonelli M. et al. Prognostic value of troponin T and I among asymptomatic patients with end stage renal disease: a meta-analysis // *Circulation.* 2005; 112: 3088.

64. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease // *Kidney international, Suppl.* 2013; 3: 1–150.

65. Rubin J., Matsushita K., Ballantyne C.M., Hoogeveen R., Coresh J., Selvin E. Chronic hyperglycemia and subclinical myocardial injury // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 59 (5): 484–489.

66. Testa L., Van Gaal W.J., Biondi Zoccai G.G. et al. Myocardial infarction after percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of troponin elevation applying the new universal definition // *QJM.* 2009; 102: 369–378.

67. Miller W.L., Garratt K.N., Burritt M.F. et al. Baseline troponin level: key to understanding the importance of post-PCI troponin Elevations // *Eur. Heart J.* 2006; 27: 1061–9.

68. Prasad A., Rihal C.S., Lennon R.J. et al. Significance of periprocedural myonecrosis on outcomes after percutaneous coronary intervention: an analysis of preintervention and postintervention troponin T levels in 5487 patients // *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2008; 1: 10–9.

69. Kavsak P.A., Walsh M., Srinathan S. et al. High sensitivity troponin T concentrations in patients undergoing noncardiac surgery: a prospective cohort study // *Clin. Biochem.* 2011; 44: 1021–4.

70. Devereaux P.J., Chan M.T., Alonso-Coello P. et al. Association between postoperative troponin levels and 30-day mortality among patients undergoing noncardiac surgery // *JAMA.* 2012; 307: 2295–304.

71. Meune C., Balmelli C., Twerenbold R. et al. Patients with acute coronary syndrome and normal high-sensitivity troponin // *Am. J. Med.* 2011; 124 (12): 1151–7.

72. Hoeller R., Rubini Giménez M. et al. Normal presenting levels of high-sensitivity troponin and myocardial infarction // *Heart.* 2013; Apr 19.

73. Body R., Carley S., McDowell G. et al. Rapid exclusion of acute myocardial infarction in patients with undetectable troponin using a high-sensitivity assay // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 58 (13): 1332–1339.

74. Keller T., Zeller T., Ojeda F. et al. Serial changes in highly sensitive troponin I assay and early diagnosis of myocardial infarction // *JAMA.* 2011; 306 (24): 2684–2693.

75. Aldous S.J., Richards A.M., Cullen L. et al. Early dynamic change in high-sensitivity cardiac troponin T in the investigation of acute myocardial infarction // *Clin. Chem.* 2011; 57: 1154–60.

76. Giannitsis E., Becker M., Kurz K. et al. High-sensitivity cardiac troponin T for early prediction of evolving non-ST-segment elevation myocardial infarction in patients with suspected acute coronary syndrome and negative troponin results on admission // *Clin. Chem.* 2010; 56: 642–50.

77. Eggers K.M., Jaffe A.S., Venge P. et al. Clinical implications of the change of cardiac troponin I levels in patients with acute chest pain – an evaluation with respect to the Universal Definition of Myocardial Infarction // *Clin. Chim. Acta.* 2011; 412: 91–7.

78. Apple F.S., Pearce L.A., Smith S.W. et al. Role of monitoring changes in sensitive cardiac troponin I assay results for early diagnosis of myocardial infarction and prediction of risk of adverse events // *Clin. Chem.* 2009; 55: 930–7.

79. Thygesen K., Mair J., Giannitsis E. et al. How to Use High-Sensitivity Cardiac Troponins in Acute Cardiac Care // *Eur. Heart J.* 2012; 33 (18): 2252–2257.

80. Mueller M., Biener M., Vafaei M. et al. Absolute and relative kinetic changes of high-sensitivity cardiac troponin T in acute coronary syndrome and in patients with increased troponin in the absence of acute coronary syndrome // *Clin. Chem.* 2012; 58: 209–18.

81. Reichlin T., Irfan A., Twerenbold R. et al. Utility of absolute and relative changes in cardiac troponin concentrations in the early diagnosis of acute myocardial infarction // *Circulation* 2011; 124: 136–45.

82. O'Gara P.T., Kushner F.G., Ascheim D.D. et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 61 (4): 78–140.

83. Korley F.K., Jaffe A.S. Preparing the United States for High-Sensitivity Cardiac Troponin Assays // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; Feb 1: S0735–1097.

84. Saunders J.T., Nambi V., de Lemos J.A. et al. Cardiac troponin T measured by a highly sensitive assay predicts coronary heart disease, heart failure, and mortality in the Atherosclerosis Risk in Communities Study // *Circulation.* 2011; 123 (13): 1367–1376.

85. Neeland I.J., Drazner M.H., Berry J.D. et al. Biomarkers of chronic cardiac injury and hemodynamic stress identify a malignant phenotype of left ventricular hypertrophy in the general population // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 61 (2): 187–195.

86. Wang T.J., Wollert K.C., Larson M.G. et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress: the Framingham Heart Study // *Circulation.* 2012; 126 (13): 1596–1604.

87. Latini R., Masson S., Anand I.S. et al. Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure // *Circulation.* 2007; 116 (11): 1242–1249.

88. Omland T., de Lemos J.A., Sabatine M.S. et al. Prevention of Events with Angiotensin Converting Enzyme Inhibition (PEACE) Trial Investigators. A sensitive cardiac troponin T assay in stable coronary artery disease // *N. Engl. J. Med.* 2009; 361 (26): 2538–2547.

89. Omland T., Pfeiffer M.A., Solomon S.D. et al. Prognostic value of cardiac troponin I measured with a highly sensitive assay in patients with stable coronary artery disease // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 61 (12): 1240–9.

90. Beatty A.L., Ku I.A., Christenson R.H., De Filippi C.R. et al. High-sensitivity cardiac troponin T levels and secondary events in outpatients with coronary heart disease from the Heart and Soul Study // JAMA Intern. Med. 2013; 173 (9): 763–9.
91. Eggers K.M., Venge P., Lindahl B. et al. Cardiac troponin I levels measured with a high-sensitive assay increase over time and are strong predictors of mortality in an elderly population // J. Am. Coll. Cardiol. 2013; 61 (18): 1906–13.
92. Klingenberg R., Matte C.M., Wyss C. et al. High-sensitivity Troponins – Difficult Friends in Acute Coronary Syndromes // US Cardiology. 2012; 9 (2): 121–5.
93. Morrow D.A., Cannon C.P., Rifai N. et al. Ability of minor elevations of troponins I and T to predict benefit from an early invasive strategy in patients with unstable angina and non-ST elevation myocardial infarction: Results from a randomized trial // JAMA 2001; 286: 2405–2412.
94. Kastrati A., Mehilli J., Neumann F.J. et al. Abciximab in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention after clopidogrel pretreatment: The ISAR-REACT 2 randomized trial // JAMA. 2006; 295: 1531–1538.
95. Frey N., Dietz A., Kurowski V., Giannitsis E. et al. Angiographic correlates of a positive troponin T test in patients with unstable angina // Crit. Care Med. 2001; 29: 1130–1136.
96. Anderson J.L., Adams C.D., Antman E.M. et al. American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina / non-ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology / American Heart Association Task Force on Practice Guidelines // J. Am. Coll. Cardiol. 2007; 50 (7): e1–e157.
97. Wallentin L., James S.K., Giannitsis E. et al. Outcomes with ticagrelor versus clopidogrel in relation to high sensitivity troponin-T in non-ST-elevation acute coronary syndrome patients managed with early invasive or non-invasive treatment: A substudy from the Prospective Randomized PLATElet Inhibition and Patient Outcomes (PLATO) Trial // Circulation. 2012; 126: A15929.
98. Giannitsis E., Wallentin L., James S.K. et al. Planned invasive compared to conservative treatment in patients with negative high sensitivity troponin at randomization in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome: A Platelet Inhibition and Patient Outcomes (PLATO) Trial Blood-Core Subgroup Analysis // Circulation. 2012; 126: A17278.
99. García-García H.M., Oemrawsingh R.M., Brugaletta S. et al. Darapladib effect on circulating high sensitive troponin in patients with acute coronary syndromes // Atherosclerosis. 2012; 225 (1): 142–7.
100. Вельков В.В. С-реактивный белок и липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2: новые факты и новые возможности для диагностики с и стратификации сердечно-сосудистых рисков // Клинико-лабораторный консилиум. 2009; 6 (31): 28–33. Электронная версия: <http://www.diakonlab.ru/files/Docs/SciArticles/CRP-Lp-PLA2.pdf>. (Последний доступ 10.08.2013)
101. Вельков В.В. Высококчувствительные кардиальные маркеры и реклассификация сердечно-сосудистых рисков: цена вопроса и цена ответа // Клинико-лабораторный консилиум. 2012; 3 (43): 40–55. Электронная версия: <http://www.diakonlab.ru/files/Docs/SciArticles/RiskreclassifiedVelkovVV2012.pdf>. (Последний доступ 10.08.2013)
102. Hoshida S., Fukutomi M., Eguchi K. et al. Change in High-Sensitive Cardiac Troponin T on Hypertensive Treatment // Clin. Exp. Hypertens. 2012; May 25.
103. Tsounis D., Deftereos S., Bouras G. et al. High sensitivity troponin in cardiovascular disease. Is there more than a marker of myocardial death? // Curr. Top. Med. Chem. 2013; 13 (2): 201–15.
104. Shah A.S., Newby D.E., Mills N.L. High sensitivity cardiac troponin in patients with chest pain // BMJ. 2013; Jul 22; 347: f4222.

## РОЛЬ НЕЙТРОФИЛОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

А. Е. КРАТНОВ

ГБОУ ВПО Ярославская государственная медицинская академия

**Резюме.** В обзоре анализируются современные представления о роли нейтрофилов в развитии и течении ишемической болезни сердца. Представлены данные, полученные в последние годы, которые свидетельствуют об изменении функциональной активности нейтрофилов под влиянием факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. Доказано, что часто встречающиеся факторы риска (курение, ожирение) способствуют праймированию нейтрофилов на фоне снижения внутриклеточной активности антиоксидантных ферментов. У больных ишемической болезнью сердца выявленное состояние нейтрофилов может сменяться их явной активацией, приводящей к неконтролируемому производству активных форм кислорода и окислительному стрессу с развитием эндотелиальной дисфункции.

**Ключевые слова:** нейтрофилы, активные формы кислорода, антиоксиданты, ишемическая болезнь сердца, факторы риска.

## A ROLE FOR NEUTROPHILS IN PATHOGENESIS OF ISCHEMIC HEART DISEASE

A.E. KRATNOV

State Budget Educational Institution Of Higher Professional Education  
Yaroslavl State Medical Academy

**Summary.** In the review modern representations about a role of neutrophils in development and current of ischemic heart disease are analyzed. The data received last years which testify to change of functional activity of neutrophils under influence of risk factors of cardiovascular diseases are submitted. It is proved, that frequently meeting risk factors (smoking, obesity) promote priming effect of neutrophils on a background of decrease endocellular activity antioxidative enzymes. In patients with ischemic heart disease the revealed condition of neutrophils can be replaced by their obvious activation resulting in uncontrollable manufacture of active forms oxygen and oxidative stress with development endothelial dysfunctions.

**Key words:** neutrophils, reactive forms of oxygen, antioxidance, ischemic heart disease, risk factors.

### Данные для корреспонденции

Кратнов Андрей Евгеньевич, д. м. н., профессор, заведующий кафедрой терапии педиатрического факультета Ярославской государственной медицинской академии  
Почтовый адрес: 150047, г. Ярославль, ул. Чехова, 34  
Телефон: (4852) 64-58-63 раб.  
E-mail: kratnov@mail.ru

### Список сокращений:

- АФК — активные формы кислорода
- ИБС — ишемическая болезнь сердца
- НАД — никотинамидадениндинуклеотид
- НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НФ — нейтрофил
- СagA — ассоциированный с цитотоксином ген А
- Ig — иммуноглобулин
- IL — интерлейкин
- NF-kb — ядерный фактор транскрипции каппа b
- TNF $\alpha$  — фактор некроза опухоли  $\alpha$
- VCAM-1 — молекула адгезии клеток сосудов 1

Ишемические заболевания сердечно-сосудистой системы, прежде всего инфаркт миокарда и ишемический инсульт, являются ведущей причиной смерти населения развитых стран и Российской Федерации [1, 2]. Важная роль в уменьшении смертности принадлежит профилактике развития сердечно-сосудистых заболеваний. Общепринятой концепцией профилактики смертности от ишемической болезни сердца (ИБС) является концепция факторов риска. В проведенном международном исследовании 52 стран, включающих и Россию, выявлено, что риски сердечно-сосудистых заболеваний, ассоциируемые с наиболее важными факторами (курение, артериальная гипертония, сахарный диабет, абдоминальное ожирение, недостаточное потребление овощей и фруктов, низкая физическая активность, чрезмерное употребление алкоголя, нарушения липидного обмена, негативные психосоциальные факторы), являются общими для всех географических регионов и этнических групп [3]. В последние годы доказано, что в оценке риска развития сердечно-сосудистых заболеваний необходимо учитывать также бессимптомные атеросклеротические изменения сосудов (увеличение толщины комплекса интима-медиа сонных артерий, снижение лодыжечно-плечевого индекса), генетические факторы (мутации генов фактора V, протромбина, тромбоцитарной мембраны и др.), повышение в крови уровня тромбина [4]. Дискутируется вопрос о прогностической роли биомаркеров воспаления в оценке риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Среди воспалительных прогностических маркеров привлекает внимание увеличение количества лейкоцитов в периферической крови. Показано, что повышение их уровня, даже в пределах нормы, является маркером сердечно-сосудистых осложнений [5]. Поскольку основными эффекторными клетками среди лейкоцитов являются нейтрофилы (НФ), составляющие к тому же их большинство, они являются объектом изучения при ИБС.

В последние годы доказано участие НФ на разных этапах развития сердечно-сосудистых заболеваний. Правилем большинства случаев тромбоза коронарных сосудов, развивающегося при инфаркте миокарда, является тромбозис (спонтанный или с помощью тромболитических средств). Хотя при ранней реперфузии миокарда существует возможность предотвратить или уменьшить развитие некроза, она часто сопровождается развитием так называемого «реперфузионного синдрома» с повреждением миокарда [6]. Среди различных эффектов, наблюдаемых при «реперфузионном синдроме» (активация «собственной» калликреин-кининовой системы сердца, транзиторная гипоксия, апоптоз миокардиоцитов, угнетение сократимости миокарда, генерация аритмий), важное значение имеет образование активных форм кислорода (АФК) в кардиомиоцитах и эндотелиоцитах с последующим возникновением окислительного стресса [7]. Полагают, что предшествующая ишемия

миокарда, характеризующаяся резким снижением парциального давления кислорода, «сенситизирует» миокард к реперфузионному «взрыву» окислительных свободно-радикальных реакций. При ишемии миокарда окисление субстратов цикла Кребса в митохондриях подавлено, вследствие чего может возрастать содержание НАДФ·Н и НАД·Н, приводя к одноэлектронному восстановлению кислорода с образованием супероксидного анион-радикала [8]. Существует мнение, что усиление выработки АФК при реперфузии имеет целью ингибировать дыхательную цепь и уменьшить поглощение митохондриями  $Ca^{2+}$ , уровень которого в кардиомиоцитах повышается при реперфузии после 30-минутной ишемии, способствуя развитию аритмий [9]. АФК модулируют белки ионного транспорта кардиомиоцитов. В частности, супероксидный анион-радикал и пероксид водорода в повышенных концентрациях ингибируют натриевые и кальциевые ионные насосы, блокируют кальмодулин, угнетают рианодинорный рецептор и вызывают массивный выход  $Ca^{2+}$  из клетки [10]. Однако повышение восстановительного потенциала клетки миокарда способствует диссоциации из комплексов с ферритином ионов  $Fe^{2+}$ , взаимодействие которых с пероксидом водорода рассматривается как один из источников реакционноспособных гидроксильных радикалов, индуцирующих переокисную деструкцию мембранных фосфолипидов кардиомиоцитов [11]. Показано, что гиперпродукция АФК при восстановлении коронарного кровотока после кратковременной, но повторной ишемии (10–20 минут) сопровождается ишемическим некрозом (апоптозом) кардиомиоцитов с той или иной степенью их распада [12]. Свободные радикалы могут также образовываться на мембранах клеток вследствие превращения арахидоновой кислоты и аутоокисления катехоламинов, которые в значительных количествах образуются при спазме коронарных сосудов и высвобождаются из ишемизированного миокарда [13].

Важным источником кислородных радикалов при реперфузии миокарда являются активированные НФ [14]. Выявлена воспалительная реакция ишемизированной ткани, которая характеризуется отеком и клеточной инфильтрацией, состоящей из ранней фазы инфильтрации НФ (24–48 часов) и последующей фазы инфильтрации моноцитами [15, 16]. Обструкция активированными НФ микроциркуляторного русла на участке ишемии приводит к развитию феномена невосстановления кровотока (*“no-reflow phenomenon”*) капилляров, в том числе коллатералей, который интерферирует с реоксигенацией миокарда [17, 18]. При окклюзии коронарной артерии число фагоцитов в зоне ишемии возрастает в 8–11 раз. НФ в отличие от эритроцитов и тромбоцитов при практически одинаковом диаметре клеток имеют вдвое больший корпускулярный объем. Также НФ обладают крайне высокой вязкостью цитоплазмы, большой склонностью к адгезии, чрезвычайно высокой прочностью адгезировавшей клетки в капилляре как

преграды для кровотока, имеют меньшую скорость движения. Реализация феномена невосстановления кровотока реализуется на фоне низкого перфузионного давления в капиллярах при стенозирующем атеросклерозе, способствующего деформации и прекращению движения НФ по миокардиальным капиллярам [19]. Усугубление ограничения коронарного кровотока осуществляется продуктами (пептидлейкотриены, лейкотриены C<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>) активированного фагоцитами липооксигеназного метаболизма арахидоновой кислоты. Они вызывают локальную вазоконстрикцию, стимулируют последующую миграцию НФ в зону ишемии, активируют образование моногидроксильных производных арахидоновой кислоты, встраивающихся в мембранные фосфолипиды кардиомиоцитов и повреждающих их [20]. Окклюзия коронарной артерии НФ при феномене невосстановления кровотока сопровождается активацией их чрескапиллярной миграции в ишемизированную ткань [21]. Функциональная активность НФ значительно возрастает уже после 5-минутной окклюзии коронарной артерии и последующей реперфузии [22]. НФ разрушаются внутри миокарда через 2 мин после реперфузии, что приводит к повышению концентрации эластазы и лактоферрина в коронарном синусе по сравнению с периферической кровью [18].

Ведущим механизмом зависимого от НФ повреждения миокарда является гиперпродукция ими АФК. Цитотоксический эффект производимых НФ метаболитов кислорода, используемый природой для уничтожения патогенных микроорганизмов и собственных клеток-мутантов, при неконтролируемой утечке может привести к необратимым повреждениям молекул липидов, белков и нуклеиновых кислот. Преимущественным субстратом для воздействия кислородных радикалов служат ненасыщенные фосфолипиды, образующие бислойную липидную мембрану. Полагают, что при ИБС свободные радикалы кислорода, внедряясь в мембраны кардиомиоцитов, оказывают детергентное действие, способствуя протонной проницаемости и неконтролируемому току катионов. Конечные продукты перекисного окисления липидов у больных ИБС повреждают сарколемму, саркоплазматический ретикулум митохондрий, увеличивают проницаемость этих мембранных структур для Ca<sup>2+</sup> и изменяют диссоциацию кальций-фосфолипидного комплекса. Сульфгидрильные участки рианодинных рецепторов, через которые регулируется высвобождение Ca<sup>2+</sup> из саркоплазматической сети, могут быть окислены АФК, что приводит к их открытию [8, 23]. Установлена связь между нейтрофилией в периферической крови и увеличением риска смерти после перенесенного инфаркта миокарда [24]. Выявлено, что при поступлении в стационар у больных с острым коронарным синдромом увеличение количества НФ в периферической крови сопровождается ростом образования в фагоцитах супероксидного анион-радикала. При изучении внутриклеточного метаболизма НФ в зависимости от исхода

выявлено, что активация их кислородзависимого метаболизма при поступлении в стационар у пациентов с фатальным исходом в течение года наблюдения сопровождалась выраженным угнетением активности ключевого антиоксидантного фермента — глутатионредуктазы, которая осуществляет регенерацию окисленного глутатиона при участии НАДФ·Н. Снижение активности глутатионредуктазы в НФ может быть обусловлено угнетением активности мембраносвязанных ферментов (глюкозо-6-фосфатазы, аденилатциклазы и других) соединениями альдегидной природы. Выявленный рост активности прооксидантного фермента — миелопероксидазы, участвующей в образовании хлорноватой кислоты, при взаимодействии которой с липидными радикалами образуются активные галоидные радикалы, сопровождался увеличением содержания в крови малонового диальдегида [25, 26]. Не исключено, что снижение активности глутатионредуктазы в НФ может явиться причиной предрасположенности клеток к разрушению. Это подтверждают экспериментальные данные, свидетельствующие, что увеличение образования в клетках активных форм кислорода в сочетании со снижением содержания глутатиона и НАДФ·Н способно приводить их к некрозу, стимулирующему воспалительную реакцию окружения [27]. Таким образом, развитие ИБС, а также наступление кардиальной смерти ассоциируется не только с нейтрофилией, но изменением внутриклеточного метаболизма фагоцитов (активация кислородзависимого метаболизма и снижение антиоксидантной защиты), которое не только повышает эффекторный потенциал клетки, но и предрасполагает ее к разрушению. Попадающие в системный кровоток АФК экспрессируют в эндотелии молекулы адгезии, способствующие агрегации клеток крови и нарушению микроциркуляции. Выявлено, что удаление лейкоцитов из крови приводит к уменьшению повреждения эндотелия коронарных сосудов при реперфузии [28].

В последние годы показано, что изменения функциональной активности НФ наблюдаются не только при ИБС, но значительно раньше — у пациентов с наличием факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. Были выявлены изменения внутриклеточного метаболизма НФ у курящих здоровых лиц и людей, страдающих ожирением. У здоровых людей, курящих на момент исследования, выявлялась нейтрофилия, сопровождающаяся праймированием фагоцитов, которое обусловлено, вероятно, изменениями рецепторной чувствительности клеток. У здоровых людей с высокой интенсивностью курения (индекс курящего человека более 50 пачка-лет) также выявлялась нейтрофилия, сопровождающаяся снижением активности ферментов антиоксидантной защиты — каталазы и глутатионредуктазы. Снижение потенциала антиоксидантной защиты НФ при увеличении интенсивности курения ассоциировалось с достоверным ростом уровня молекулы адгезии клеток сосудов 1 (VCAM-1), т. е. развитием дисфунк-

кции эндотелия [29]. Существуют данные, что курение сопровождается окислительным стрессом, который проявляется увеличением содержания в крови окисленных липопротеинов низкой плотности и снижением фермента параоксоназы, защищающей липопротеины от окислительной модификации [30, 31]. Выкуривание даже одной сигареты здоровым человеком резко увеличивало концентрацию окисленных фосфолипидов (фрагментированного фосфатидилхолина) на фоне роста количества в крови циркулирующих НФ [32]. Показано, что развитие окислительного стресса, как у активных, так и пассивных курильщиков происходит на фоне депрессии антиоксидантной защиты — снижения содержания в эритроцитах и сыворотке крови супероксиддисмутазы и каталазы [33, 34]. Праймирование НФ при курении может быть обусловлено активацией ядерного фактора транскрипции каппа В (NF- $\kappa$ B). Существуют данные, что никотин модулирует в эндотелиальных клетках ген NF- $\kappa$ B, контролирующей синтез провоспалительных цитокинов, экспрессию адгезивных молекул (VCAM-1) и хемоаттрактантов фагоцитов [35, 36]. Экспрессия NF- $\kappa$ B в свою очередь сопряжена с гиперпродукцией фагоцитами активных форм кислорода, преимущественно гидроксил-радикала. Полагают, что НФ вовлечены в процесс цитокин-опосредованного межклеточного взаимодействия, при котором совокупность образуемых ими активных форм кислорода через экспрессию NF- $\kappa$ B ведёт к индукции выработки провоспалительных цитокинов, которые в свою очередь праймируют фагоцитарную НАДФ-оксидазу [37, 38].

Проведенные в последние годы исследования показали, что ожирение приводит к развитию различных заболеваний, высокой инвалидизации и снижению общей продолжительности жизни больных [39]. Доказано, что жировая ткань является не пассивным накопителем энергии, а представляет собой активный метаболический и эндокринный орган, продуцирующий адипоцитокينات (пептидные гормоны) и адипокины. Последние включают цитокины (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, трансформирующий фактор роста, интерферон, лептин, адипонектин, резистин, ангиотензиноген), факторы системы комплемента (ингибитор активации плазминогена I, фибриноген, ангиопоэтинсвязанные протеины, фактор комплемента-3) и хемоаттрактанты (хемотаксический моноцитарный протеин-1, макрофагальный воспалительный протеин). Поскольку жировая ткань продуцирует провоспалительные цитокины, следовательно, ожирение может рассматриваться как слабовыраженное воспаление [40, 41]. Рост содержания С-реактивного белка у пациентов с ожирением II–III степени без ИБС наблюдался на фоне увеличения производства в НФ пероксида водорода, максимальный рост которого у пациентов с выраженным ожирением (III степени) сопровождался снижением внутриклеточной активности антиоксидантных ферментов, преимущественно каталазы [42].

Несмотря на то, что инфекция не относится к факторам риска сердечно-сосудистых заболеваний, по-прежнему обсуждается роль некоторых ее представителей (*Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*) в развитии ИБС. Полагают, что инфицирование *H. pylori* ассоциировано с развитием системных заболеваний. Формирование аутоиммунного компонента в патогенезе хеликобактерной инфекции связывается с тем, что иммунологический ответ макроорганизма в связи с инфицированием *H. pylori* сопровождается образованием провоспалительных агентов — фактора активации тромбоцитов, TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-8, IL-12. При обострении хронического гастрита увеличивается уровень циркулирующих иммунных комплексов, с которыми связывают патологические процессы в других органах и тканях (артриты, гломерулонефрит, васкулиты и т. д.), ассоциированные с заболеваниями органов пищеварения. По мере увеличения степени обсеменения *H. pylori* слизистой оболочки желудка растет местная продукция IgA и IgG, а также образование циркулирующих иммунных комплексов, которые способны активировать НФ, взаимодействуя с их специальными рецепторами [43]. Получены данные, что увеличение степени инфицированности *H. pylori* у больных ИБС сопровождается праймированием НФ, снижением внутриклеточной активности антиоксидантной защиты на фоне увеличения содержания в крови вторичных продуктов свободнорадикального окисления липидов [44]. Повышение титра IgG антител к *H. pylori* у больных ИБС коррелировало с повышением количества лейкоцитов в периферической крови и уровня С-реактивного белка [45]. Результаты некоторых исследований выявили связь между сердечно-сосудистой патологией и инфекцией *H. pylori* только у пациентов с наличием иммуногенного CagA-протеина (cytotoxin-associated gene A), который инициирует образование сывороточных IgG-антител, вступающих в реакции с антигеном и активирующих комплемент по классическому пути [46]. Таким образом, установленным фактом является влияние факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний на функциональную активность НФ, проявляющуюся праймированием фагоцитов, активацией кислородзависимого метаболизма и снижением активности антиоксидантных ферментов.

Поскольку для российских больных ИБС характерно наличие большого числа сопутствующих заболеваний и факторов риска [2], можно полагать, что их накопление с увеличением возраста способствует нахождению НФ в предвозбужденном состоянии. Так, в отличие от подростков, у взрослых людей без ИБС выявлено праймирование НФ на фоне снижения внутриклеточной активности глутатионредуктазы [47]. Известно, что кроме явной активации, фагоциты подвергаются праймированию или скрытой переадаптации (кондиционированию), которая связана с реактивными сдвигами на рецепторном и пострецепторном уровнях и меняет чувствительность клеток к вторичным стимулам [48]. В определен-

ных условиях праймирование НФ на фоне снижения активности антиоксидантных ферментов может сменяться явной активацией, приводящей к неконтролируемому производству активных форм кислорода и развитию окислительного стресса с развитием эндотелиальной дисфункции [49]. Несмотря на наличие фактов о важной роли НФ в развитии и течении ИБС на сегодняшний день не существует крупных исследований по влиянию лекарственных средств на их функциональную активность. Использование витаминов-антиоксидантов не привело к достижению ощутимых успехов в профилактике и лечении ИБС. Необходим поиск лекарственных средств, влияющих как на адгезию, так и нормализующих антиоксидантную защиту в НФ. На сегодняшний день существуют лекарственные средства, способные повлиять на состояние антиоксидантной защиты. В последние годы в период острого ишемического инсульта применяется отечественный препарат Мексидол (соль эмоксипина и янтарной кислоты), под действием которого происходит увеличение концентрации восстановленной формы глутатиона, активация системы супероксиддисмутазы и церулоплазмينا [50].

#### Литература

1. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice // *EJCP*. 2007; 14 (2): 111–113.
2. Шальнова С.А., Деев А.Д. Ишемическая болезнь сердца в России: распространенность и лечение (по данным клинико-эпидемиологических исследований) // *Тер. архив*. 2011; 1: 7–12.
3. Yusuf S., Hawken S., Ounpuu S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study // *Lancet*. 2004; 364: 937–952.
4. Комаров А.Л., Шахматова О.О., Стамбольский Д.В. и др. Факторы риска тромботических осложнений и прогноз у больных с хронической формой ишемической болезни сердца // *Кардиология*. 2009; 11: 4–10.
5. Belch J.J., McLaren M., Kahn F. et al. The inflammatory process in intermitted claudication // *European Heart Journal Supplements*. 2002; 4: 31–34.
6. Bulkely B.H., Hutchins G.M. Myocardial consequences of coronary artery bypass graft surgery: the paradox of necrosis in areas of revascularization // *Circulation*. 1977; 56: 906–913.
7. da Silva M.M., Sartori A., Belisle E., Kowaltowski A.J. Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H2O2 release, and enhances K+ transport // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 285: H154–H162.
8. Ланкин В.З., Тухазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // *Кардиология* 2000; 7: 48–57.
9. Meissner A., Morgan J.P. Contractile dysfunction and abnormal Ca2+ modulation during postischemic reperfusion in rat heart // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 1995; 37: H100–H111.
10. Goldhaber J.I., Liu E. Excitation-contraction coupling in single guinea – pig ventricular myocytes exposed to hydrogen peroxide // *J. Physiol. (London)*. 1994; 477: 135–147.
11. Коган А.Х., Кудрин А.Н., Кактурский Л.В. и др. Свободнорадикальные перекисные механизмы патогенеза ишемии и инфаркта миокарда и их фармакологической регуляции // *Пат. физиол. эксперим. тер.* 1992; 2: 5–15.
12. Bolli R. Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview // *Cardiovasc. Drug. Ther.* 1991; 5: 249–268.
13. Opie L.H., Thandroyen F.T., Muller C.A., Brucknell O.L. Adrenaline-induced “oxygen-wastage” and enzyme release from, is working rat heart. Effects of calcium antagonism, beta-blocade, nicotinic acid and coronary artery ligation // *J. Mol. Cell Cardiol.* 1979; 11: 1073–1094.
14. Wahi S., Kave N., Ganguly N.K. et al. Neutrophil oxygen free radical production proportionate with the degree of myocardial ischemia // *Can. J. Cardiol.* 1991; 7: 229–233.
15. Mullane K.M., Read N., Salmon J.A., Moncada S. Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1984; 228: 510–522.
16. Williams F.M., Collins P.D., Tannièrre-Zeller M., Williams T.J. The relationship between neutrophils and increased microvascular permeability in a model of myocardial ischemia and reperfusion in the rabbit // *J. Pharmacol.* 1990; 100: 7829–7834.
17. Stein J.H., Osgood R.W., Barnes J.L. et al. The role of complement in the pathogenesis of postischemic acute renal failure // *Miner Electrolyte Metab.* 1985; 11: 256–261.
18. Simpson P.J., Fantone J.C., Mickelson J.K. et al. Identification of a time-window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion // *Circ. Res.* 1988; 63: 1070–1079.
19. Ведерников Ю.П., Вихерт А.М. Функция эндотелия и спазм коронарной артерии // *Бюлл. ВКНЦ АМН СССР*. 1987; 2: 120–127.
20. Мойбенко А.А., Колчин Ю.Н., Коцюруба В.Н. Лейкотриены и ишемия миокарда // *Кардиология* 1991; 5: 79–83.
21. Редчиц Е.Г. Участие полиморфноядерных лейкоцитов в патогенезе ишемической болезни сердца // *Кардиология* 1989; 12: 115–120.
22. Клебанов Г.И., Крейна М.В., Козин В.М. и др. Динамика изменения функциональной активности полиморфноядерных лейкоцитов крови при обратимой ишемии миокарда у собак // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины*. 1988; 9: 297–299.
23. Strong J.P., Malcom G.T., McMahan C.A. et al. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study // *JAMA*. 1999; 281: 727–735.
24. Kyne L., Hausdorff J.M., Knight E. et al. Neutrophilia and congestive heart failure after acute myocardial infarction // *Am. Heart J.* 2000; 139 (1): 94–100.
25. Кратнов А.Е. Состояние кислородзависимого метаболизма фагоцитов и антиоксидантной защиты плазмы крови при острых коронарных синдромах в зависимости от исхода в период госпитализации // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2002; 6: 6–13.
26. Кратнов А.Е., Хабарова И.В. Изменения внутриклеточного метаболизма нейтрофилов и смертельный исход при ишемической болезни сердца // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; 1: 20–22.
27. Ueda S., Nakamura H., Masutani H. et al. Redox regulation of caspase-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c // *J. Immunol.* 1998; 161 (12): 6689–6695.
28. Scannell G., Waxman K., Vaziri N. et al. Hypoxia-induced alterations of neutrophil membrane receptors // *J. Surg. Res.* 1995; 59: 141–145.
29. Кратнов А.Е., Хабарова И.В., Пивень О.Е. Влияние курения на уровень адгезии клеток сосудов 1 (SVCAM-1), С-реактивного белка и внутриклеточный метаболизм нейтрофилов у здоровых людей // *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2009; 4: 18–23.

30. Drexler H., Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999; 31: 51–60.
31. James R.W., Leviev I., Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease // *Circulation.* 2000; 101: 2252–2257.
32. Frey B., Haupt R., Alms S. et al. Increase in fragmented phosphatidylcholine in blood plasma by oxidative stress // *J. Lipid. Res.* 2000; 41: 1145–1153.
33. Sharma S.B., Dwivedi S., Kumar N. et al. Studies on oxidative stress, serum iron and iron binding capacity in subjects prone to the risk of coronary artery disease // *Indian Heart J.* 2000; 52: 583–586.
34. Yildiz L., Kayaoglu N., Aksoy H. The changes of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes of active and passive smokers // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002; 40: 612–615.
35. Zhang S., Day I., Ye S. Microarray analysis of nicotine-induced changes in gene expression in endothelial cells // *Physiol. Genomics.* 2001; 5: 187–192.
36. Borregaard N. The human neutrophil. Function and dysfunction // *Eur. J. Haematol.* 1988; 41: 401–413.
37. Schreck R., Albermann K.A., Baeuerle P.A. Nuclear factor  $\kappa$ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells // *Free Rad. Res. Comm.* 1992; 17: 221–237.
38. Beutels B., Cerami A. The biology of cachectin/TNF – a primary mediator of the host response // *Ann. Rev. Immunol.* 1989; 7: 625–655.
39. Malnick S.D., Knobler H. The medical consequences of obesity // *Q. J. Med.* 2006; 99: 565–579.
40. Matt C. Cave, Ryan T. Hurt, Thomas H. Frazier et al. McClain and Stephen Obesity, Inflammation, and the Potential Application of Pharmacconutrition // *Nutr. Clin. Pract.* 2008; 23(1): 16–34.
41. Das U.N. Is obesity an inflammatory condition? // *Nutrition* 2001; 17: 953–966.
42. Кратнов А.Е. Внутриклеточный метаболизм нейтрофилов при ожирении // *Российский иммунологический журнал.* 2012; 1 (6): 80–84.
43. Логинов А.С., Царегородцева Т.М., Зотина М.М. Иммунная система и болезни органов пищеварения. М.: Медицина, 1986.
44. Кратнов А.Е. Роль инфекции *Helicobacter pylori* в активации «окислительного стресса» у больных с обострением ишемической болезни сердца // *Медицинская иммунология.* 2004; 6 (6): 541–546.
45. Кратнов А.Е., Павлов О.Н. С-реактивный белок и антитела к *Helicobacter pylori* у больных с ишемической болезнью сердца // *Медицинская иммунология.* 2007; 4–5: 523–527.
46. Migneco A., Ojetti V., Specchia L. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* infection improves blood pressure values in patients affected by hypertension // *Helicobacter.* 2003; 8: 585–589.
47. Кратнов А.Е., Хабарова И.В., Кратнов А.А. Сравнительная характеристика внутриклеточного метаболизма нейтрофилов у здоровых подростков и взрослых людей без ишемической болезни сердца // *Клиническая медицина.* 2009; 9: 32–36.
48. Маянский А.Н. Кондиционирование нейтрофила // *Усп. совр. биол.* 1990; 109 (1): 90–105.
49. Кратнов А.Е. Маркеры воспаления и внутриклеточный метаболизм нейтрофилов у больных с острым коронарным синдромом и нормальным значением тропонина Т // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2011; 4: 449–452.
50. Воробьева О.В. Оксидативный стресс, ассоциированный с цереброваскулярной дисфункцией: возможности терапии // *Фарматека.* 2010; 5: 1–5.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА У ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМИ СТЕНОЗАМИ СОННЫХ АРТЕРИЙ

А. А. ШМОНИН<sup>1,2</sup>, Н. М. ЛАЗАРЕВА<sup>1</sup>, Л. Н. СТУКОВА<sup>1</sup>, Е. А. БОНДАРЕВА<sup>1</sup>, В. В. АЧКАСОВА<sup>1</sup>,  
М. А. АЛЕКСАНДРОВА<sup>1</sup>, Ю. В. ЭМАНУЭЛЬ<sup>1</sup>, В. М. ЛАПИНА<sup>1</sup>, С. В. ЛАПИН<sup>1</sup>, Е. В. МЕЛЬНИКОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

<sup>2</sup> Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова

**Резюме. Введение.** Мы предполагаем, что высокий уровень защитных протеинов, таких как инсулиноподобный фактор-1, -2 и пептид-3 связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGF-1, IGF-2 и IGFBP-3), может уменьшить повреждение мозга у пациентов с высоким риском цереброваскулярного события. Наша гипотеза: высокий уровень сывороточной концентрации IGF-1, IGF-2 и IGFBP-3 ассоциирован с низкой частотой транзиторных ишемических атак и ишемических инсультов у пациентов с односторонними или двусторонними атеросклеротическими стенозами сонных артерий более 60%.

**Материалы и методы.** Мы исследовали 187 пациентов 50–80 лет с односторонними и двусторонними атеросклеротическими стенозами сонных артерий 60–99%. Критерии не включения: окклюзия сонных артерий, сахарный диабет, мерцательная аритмия, наличие в анамнезе геморрагического инсульта, кардиогенного или лакунарного ишемического инсульта, острый инсульт операции на артериях головы и шеи в анамнезе, анемия, прием Кортикостероидов, Актовегина, Церебролизина, Эритропоэтина, Семакса или др. нейропротекторов и препаратов, содержащих пептиды и белки, в течение 1 недели до включения в исследование, и другие. Для оценки степени стеноза использовали комплексные показатели по данным ультразвукового дуплексного сканирования (определение стеноза «по площади», «по диаметру» и «по скорости»). Значимым считался стеноз более 60% с одной или двух сторон. Включенные пациенты были разделены на 2 группы с «симптомными» и «асимптомными» стенозами. Для статистического анализа использовали критерий Краскила–Уолеса и Манна–Уитни.

**Результаты.** Только 40 больных не имели критериев не включения и были включены в исследование. Контрольную группу составили 19 пациентов без признаков атеросклероза и не имеющие критериев не включения. Сывороточная концентрация IGF-1, IGF-2 и IGFBP-3 во всех группах не выходила за рамки референтных интервалов для данного возраста. Уровень IGF-1, IGF-2 и IGFBP-3 в группе контроля значимо не отличался от группы пациентов с «асимптомными стенозами». В группе пациентов с «симптомными стенозами» сонных артерий уровень IGF-1 и IGFBP-3 был значимо ниже, чем в группах с «асимптомными стенозами» и контроля. Наша гипотеза подтвердилась. Для дальнейшего исследования требуется увеличить объем выборки и количество показателей для оценки нейропротективных протеинов.

**Выводы.** Развитие ишемического инсульта, ТИА и «немых инсультов» у пациентов со односторонними или двусторонними атеросклеротическими стенозами сонных артерий 60–99% ассоциировано с низкой сывороточной концентрацией IGF-1 и IGFBP-3, но не IGF-2. Снижение концентрации IGF-1 и IGFBP-3 в крови может быть рассмотрено как фактор риска ишемического инсульта.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, ТИА, атеросклероз, стеноз каротидных артерий, сывороточная концентрация IGF-1, IGF-2 и IGFBP-3.

## INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR SYSTEM RESEARCH IN PATIENTS WITH ATHEROSCLEROTIC SYMPTOMATIC AND ASYMPTOMATIC CAROTID STENOSIS

A. A. SHMONIN<sup>1,2</sup>, N. M. LAZAREVA<sup>1</sup>, L. N. STUKOVA<sup>1</sup>, E. A. BONDAREVA<sup>1</sup>, V. V. ACHKASOVA<sup>1</sup>,  
M. A. ALEXANDROVA<sup>1</sup>, Y. V. EMANUEL<sup>1</sup>, V. M. LAPINA<sup>1</sup>, S. V. LAPIN<sup>1</sup>, E. V. MELNIKOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg

<sup>2</sup> V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre

**Summary. Background.** It is generally held that high serum level of protective protein — Insulin-like Growth Factor-1, -2 and Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGF-1, IGF-2 and IGFBP-3) can reduce cerebral injury in patients with high risk of cerebrovascular disease. We hypothesized that high IGF-1, IGF-2 and IGFBP-3 serum level can associated with low frequency of transient ischemic attack (TIA) and stroke occurrence.

**Methods.** We searched 187 patients aged 50–80 years with bilateral or unilateral 60–99% atherosclerotic internal carotid artery stenoses. Our exclusion criteria were acute stroke or TIA, diabetes, carotid occlusion, history of heart or vascular surgical intervention, history of stroke in posterior circulation, systemic diseases, oncology, hematologic diseases, dementia or severe cognitive impairment and atrial fibrillation. Only 40 patients didn't have exclusion criteria and were included in our investigation. The control group consisted of 19 patients without carotid artery stenoses and exclusion criteria. We used a duplex ultrasound scanning for carotid artery stenoses verification and a typical immunopherment analysis to test IGF-1, IGF-2 and IGFBP-3 serum level. Symptomatic carotid stenosis criteria: stroke, TIA, residual neurological symptomatic (Babinski sign, anisoreflexia, hemihypostesia, Marinesco signs and other). Statistical analyses were performed with Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney test.

**Results.** All results were in a reference range. IGF-1, IGF-2 and IGFBP-3 serum level in patients with asymptomatic carotid stenosis were not significantly differ from control group ( $p>0,05$ ). IGF-1 and IGFBP-3 serum level in patients with symptomatic carotid stenoses were significantly smaller than in control group ( $p<0,05$ ). Our hypothesis was confirmed. These findings demonstrate that patients with low IGF-1 and IGFBP-3 serum level can associated with high risk of cerebrovascular events (TIA, «silent» stroke and stroke) in patients with carotid stenoses. Function of this phenomenon requires further investigations.

**Conclusion.** These findings demonstrate that patients with low IGF-1 and IGFBP-3 serum level can associated with high risk of cerebrovascular events (TIA, «silent» stroke and stroke) in patients with carotid stenoses.

**Keywords:** stroke, transient ischemic attack, atherosclerosis, carotid artery stenosis, IGF-1, IGF-2 and IGFBP-3 serum level.

#### Данные для корреспонденции

Шмонин А.А. к. м. н., ассистент кафедры неврологии и нейрохирургии

с клиникой ГБОУ ВПО ПСПбГМУ имени акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ

E-mail: langendorff@gmail.com

#### Введение

В России инсульт ежегодно развивается у 400–450 тысяч человек, примерно 200 тысяч из них погибают. В стране проживает более 1 миллиона человек, перенесших инсульт, причем 80% из них являются инвалидами. Приблизительно 87% инсультов составляют ишемические [1, 12]. В связи с этим возрастает значимость проблемы профилактики и лечения больных с инсультом.

В настоящее время не существует лабораторных тестов, позволяющих оценить риск развития ишемического инсульта [9]. Предложено огромное количество различных лабораторных маркеров (С-реактивный белок, липопротеиды низкой и очень низкой плотности, липопротеин (а), липопротеид-ассоциированная фосфолипаза А2 и многие другие), но не один из них не рекомендован для оценки риска ишемического инсульта в клинической практике [9].

В работах зарубежных коллег и наших исследованиях — на моделях экспериментального инсульта у животных доказаны нейропротективные свойства таких факторов роста и нейротрофинов, как инсулиноподобный фактор роста (IGF 1 и 2 типов) [5], фактора роста фибробластов, трансформирующего ростового фактора-бета, эритропоэтина, остеогенного белка-1 и многих других [4]. Все они при введении до или после индукции ишемии мозга сокращают размер инфарктной зоны на 35–50% [2]. Известно, что при ишемическом поврежде-

нии головного мозга также увеличивается экспрессия многих факторов роста и их концентрация в крови [6, 10].

Система инсулиноподобных факторов роста состоит из двух типов рецепторов (IGF1R and IGF2R), двух типов лигандов (IGF-1 and IGF-2) и семейства 6 высокоаффинных IGF-связывающих протеинов (IGFBP 1–6), а также протеазы, вызывающие деградацию IGF-связывающих протеинов, — IGF-протеины осуществляют эндокринную, аутокринную и паракринную регуляцию процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма. IGF-1 и IGF-2 — однопечочные полипептиды с мол. весом 7,5 кДа, состоящие из 67 и 70 аминокислотных остатков. IGF-1 и IGF-2 вовлечены в развитие нервной системы в онтогенезе: нейрогенез, миелинизация, синаптогенез и дендритный спрутинг, а также в механизмы нейропротекции [13, 14]. Высокий уровень сывороточной концентрации IGF-I ассоциирован с высоким показателем коэффициента интеллекта — «IQ» у детей [11].

По данным литературы, низкое содержание IGF 1 и 2 ассоциировано с высоким сосудистым риском (как инсульта, так и инфаркта миокарда) [8]. Соответственно, повышенное содержание данного фактора в крови было связано с положительными исходами у пациентов с сосудистыми факторами риска [3, 7]. Таким образом, по-

вышенное содержание факторов роста, имеющих нейротропные свойства в крови, обеспечивает защиту мозга даже при наличии значительных факторов риска сосудистых осложнений, например, критических стенозов сонных артерий. Причем нейротропный эффект развивается независимо от причин, вызвавших повышение защитных факторов роста в крови.

**Гипотеза:** у группы пациентов со стенозами сонных артерий имеется недостаточность системы «инсулиноподобного фактора роста», что проявляется снижением факторов роста в крови и развитием клинических проявлений заболевания (ишемического инсульта и транзиторной ишемической атаки) либо прогрессированием эндотелиальной дисфункции и атеросклероза. При нормальном состоянии системы «инсулиноподобного фактора роста» не развивается клинически значимых проявлений цереброваскулярной болезни (инсультов) или развиваются более легкие формы (транзиторные ишемические атаки). Для оценки системы инсулиноподобного фактора роста у пациентов предлагается исследовать три пептида: IGF-1, IGF-2 пептид-3 связывающий IGF (IGFBP-3).

#### Цель работы

Исследовать систему инсулиноподобного фактора роста у пациентов с атеросклеротическими стенозами сонных артерий.

#### Материалы и методы

Исследование проводилось на базе СПбГМУ. Исследование является клиническим, тип исследования — срезовое. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Включались пациенты, ожидающие операций по федеральной квоте в клинике факультетской хирургии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, ФЦ сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова и Национальном медико-хирургическом центре им. Пирогова, а также пациенты, получающие лечение в клинике неврологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.

##### Критерии включения

1. Возраст от 50 до 80 лет.
2. Односторонний или двусторонний атеросклеротический стеноз сонных артерий (ВСА) 60–99%.
3. Подписание информированного согласия.

##### Критерии невключения:

1. Окклюзия сонных артерий.
2. Наличие в анамнезе геморрагического инсульта, кардиогенного или лакунарного ишемического инсульта.
3. Острый инсульт (21 день от первых симптомов инсульта).
4. Сахарный диабет.
5. Наличие признаков системного васкулита.
6. Мерцательная аритмия.
7. Порок сердца и операции на сердце.
8. Нарушения ритма с синкопальными эпизодами.

9. Операции на артериях головы и шеи в анамнезе.
10. Прием Кортексина, Актовегина, Церебролизина, Эритропоэтина, Семакса или др. нейротропных и препаратов, содержащих пептиды и белки, в течение 1 недели до включения в исследование.
11. Наличие иных причин неврологического очагового дефицита (рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др.)
12. Выраженный когнитивный дефицит (по шкале MMSE менее 20 баллов).
13. Хроническая почечная недостаточность (или повышение креатинина более 0,135).
14. Хроническая печеночная недостаточность (или повышение АЛТ и АСТ более чем в 2 раза).
15. Наличие злокачественного онкологического заболевания или заболевания крови.
16. Декомпенсированные тяжелые хронические заболевания.
17. Тяжелая хроническая обструктивная болезнь легких.
18. Обострение хронических заболеваний, инфекции, острые заболевания (инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия, ТЭЛА и т. д.).
19. Анемия (гемоглобин менее 100 г/л) или переливание крови в течение 1 мес.
20. Большая операция в течение 1 месяца.
21. Беременность, роды в течение последнего 1 года до исследования.

Пациенты со стабильной стенокардией и сердечной недостаточностью I–III, больные с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей 1–3 степени (по классификации Фонтена–Покровского) были включены.

Все пациенты, включенные в исследование, прошли обследование: неврологический осмотр, опрос и сбор анамнеза, нейровизуализация, дуплексное сканирование брахиоцефальных артерий и/или церебральная ангиография, оценка по шкале MMSE, тест рисования часов, липидный спектр крови.

Для оценки системы инсулиноподобного фактора роста у пациентов исследовались три пептида (Mediagnost): IGF-1, IGF-2, пептид-3 связывающий IGF (IGFBP-3) с применением иммуноферментного анализа.

##### Группы пациентов

1. Пациенты со стенозами сонных артерий (60–99%), не имеющие в анамнезе острых нарушений мозгового кровообращения, резидуального неврологического дефицита (последствия «немых инсультов») и ТИА — «бессимптомные стенозы» (n = 20),
2. Пациенты со стенозами сонных артерий (60–99%), имеющие в анамнезе острые нарушения мозгового кровообращения, резидуальный неврологический дефицит (последствия «немых инсультов») и ТИА (n = 20),
3. Группа сравнения — пациенты 50–80 лет, не имеющие критериев невключения и без атеросклероза сонных артерий (n = 19).

ТИА и инсульты у пациентов должны быть в бассейне пораженной артерии, а патогенетический подтип — атеротромботический или атероэмболический.

Для оценки степени стеноза использовали комплексные показатели по данным ультразвукового дуплексного сканирования (определение стеноза «по площади», «по диаметру» и «по скорости»). Значимым считался стеноз более 60% с одной или двух сторон. Включенные пациенты были разделены на 2 группы с «симптомными» и «асимптомными» стенозами.

Критерием «симптомности» является наличие одного или нескольких признаков в анамнезе:

- ишемический инсульт или ТИА, соответствующие бассейну пораженной сонной артерии;
- последствия перенесенных «немых инсультов» в виде наличия очагового неврологического дефицита, в том числе микросимптомов — псевдобульбарный синдром, анизорефлексия или симптом Бабинского, соответствующих бассейну пораженной сонной артерии.

Группу контроля составили здоровые добровольцы — пациенты, не имеющие критериев невключения, инсультов, ТИА в анамнезе. У этой группы отсутствовали признаки атеросклероза по данным дуплексного сканирования брахиоцефальных артерий (комплекс интима-медиа в сонных артериях менее 1,0).

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью программного пакета StatSoft Statistica v6.0. Значимость различий измеряемых параметров оценивалась с помощью непараметрического критерия Краскила–Уолеса (Kruskal-Wallis test) для нескольких независимых выборок и Манна–Уитни для двух независимых выборок. Все показатели на графиках представлены в виде медианы, 25% и 75% перцентилей в круглых скобках. Значения P менее чем 0,05 рассматривались как значимые.

## Результаты

Всего было обследовано 187 пациентов с односторонними или двусторонними значимыми стенозами сонных артерий, имеющих критерии включения, и только 40 пациентов из них не имели критериев невключения. Основными причинами невключения были сахарный диабет, операции на сосудах в анамнезе, операции на сердце и мерцательная аритмия.

Сывороточная концентрация IGF-1, IGF-2 и IGFBP-3 во всех группах не выходила за рамки референтных интервалов для данного возраста. Использование критерия Краскила–Уолеса продемонстрировало наличие различий между группами по уровню IGF-1 ( $p = 0,0068$ ), что позволяет использовать критерий Манна–Уитни для дальнейшего попарного сравнения. Уровень IGF-1 в группе контроля составил 146 (98; 162) мг/л, что значительно ( $p = 0,93$ ) не отличалось от группы пациентов с «асимптомными стенозами» сонных артерий 143 (119; 170) мг/л (рис. 1). В группе пациентов

с «симптомными стенозами» сонных артерий уровень IGF-1 был значительно ниже — 90 (71; 112) мг/л, чем в группах с «асимптомными стенозами» и контроля ( $p = 0,026$  и  $p = 0,0008$ , соответственно).

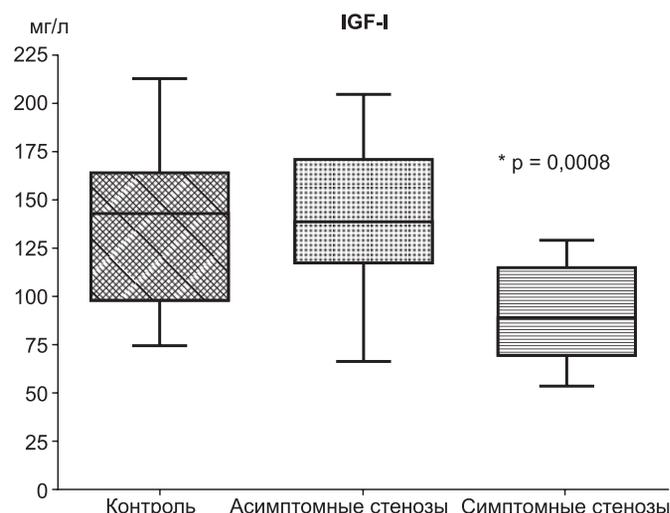


Рис. 1. Сывороточная концентрация IGF-1 во всех группах

Применение критерия Краскила–Уолеса также продемонстрировало наличие различий между группами по уровню IGF-2 ( $p = 0,0228$ ), что позволяет использовать критерий Манна–Уитни для дальнейшего попарного сравнения. Уровень IGF-2 в группе контроля составил 1238 (943; 1530) нг/мл, что значительно ( $p = 0,425$ ) не отличалось от группы пациентов с «асимптомными стенозами» сонных артерий 1287 (1056; 1789) нг/мл (рис. 2). В группе пациентов с «симптомными стенозами» сонных артерий уровень IGF-2 был незначимо ниже — 867 (742; 1050) нг/мл, чем в группе контроля ( $p = 0,0554$ ), однако по сравнению с «асимптомными стенозами» было выявлено значимое снижение ( $p = 0,008$ ).

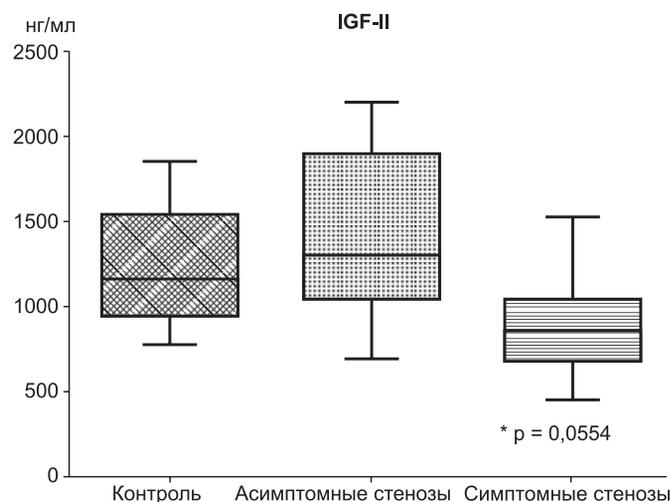


Рис. 2. Сывороточная концентрация IGF-2 во всех группах

Применение критерия Краскила–Уолеса продемонстрировало наличие различий между группами и по уровню IGFBP-3 ( $p = 0,0228$ ), что позволяет использовать критерий Манна–Уитни для дальнейшего попарного сравнения. Уровень IGFBP-3 в группе контроля составил 3186 (3087; 3956) нг/мл, что значимо ( $p = 0,9298$ ) не отличалось от группы пациентов с «асимптомными стенозами» сонных артерий 3451 (2570; 3987) нг/мл (рис. 3). В группе пациентов с «симптомными стенозами» сонных артерий уровень IGFBP-3 был значимо ниже – 2945 (2762; 3010) нг/мл, чем в группах с «асимптомными стенозами» и контроля ( $p = 0,008$  и  $p = 0,04$ , соответственно).

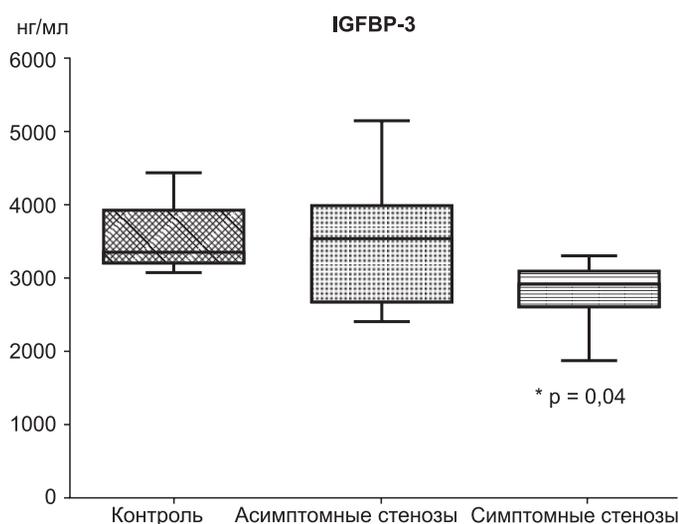


Рис. 3. Сывороточная концентрация IGFBP-3 во всех группах

Согласно нашим данным, пациенты с «асимптомными стенозами» сонных артерий более 60% не отличаются по сывороточной концентрации IGF-1, IGF-2 и IGFBP-3 от группы «здоровых добровольцев». Концентрация IGF-2 не изменялась во всех группах. То есть наше предположение о возможной роли снижения концентрации IGF-1, IGF-2 и IGFBP-3 в крови в развитии атеросклероза не подтвердилось. Однако уровень IGF-1 и IGFBP-3 в крови пациентов с «симптомными стенозами» был значимо ниже, чем в группах контроля и «асимптомных» стенозов. Эти результаты были получены на маленькой выборке. Из результатов следует, что пациенты, имеющие поражение головного мозга, при наличии значимых факторов риска отличаются низкой концентрацией в крови IGF-1 и IGFBP-3. То есть одним из факторов развития нарушения мозгового кровообращения является низкая концентрация факторов роста, обладающих нейропротективными свойствами. Для дальнейшего исследования требуется увеличить объем выборки и количество показателей для оценки нейропротективных протеинов.

## Выводы

Развитие ишемического инсульта, ТИА и «немых инсультов» у пациентов со односторонними или двусторонними атеросклеротическими стенозами сонных артерий 60–99% ассоциировано с низкой сывороточной концентрацией IGF-1 и IGFBP-3, но не IGF-2. Снижение концентрации IGF-1 и IGFBP-3 в крови может быть рассмотрено как фактор риска ишемического инсульта.

## Литература:

1. Данные сайта НАБИ: <http://www.nabi.ru>
2. Шмонин А.А., Мельникова Е.В., Власов Т.Д. Эндогенная защита при ишемическом повреждении мозга// Медлайн-экспресс 2011, № 1 (207), С.46–51.
3. Aberg D., Jood K., Blomstrand C., Jern C., Nilsson M., Isgaard J., Aberg N.D. Serum IGF-I levels correlate to improvement of functional outcome after ischemic stroke. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Jul;96 (7): E1055–64. doi: 10.1210/jc.2010–2802.
4. Bach L.A., Hsieh S., Sacano K.I., et al. Binding of mutants of human insulin-like growth factor II to insulin-like growth factor proteins 1–6 // Biol. Chem. 1992. V. 258. P. 9246–9254.
5. Blundell T.L., Bedarkar S., Humbel R.E. Tertiary structures, receptor binding and antigenicity of insulin-like growth factors // Fed. Proceedings. 1983. V. 42. P. 2592–2597
6. Clemmons D.R., Jones J.J., Busby W.H. Wright C. Role of insulin-like growth factor binding proteins in modifying IGF action // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1993. V. 692. P. 10–21
7. De Smedt A., Brouns R., Uyttenboogaart M., De Raedt S., Moens M., Wilczak N., Luijckx G.J., De Keyser J. Insulin-like growth factor I serum levels influence ischemic stroke outcome. Stroke. 2011 Aug;42 (8):2180–5. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.600783.
8. Dirnagl U., Meisel A. Endogenous neuroprotection: mitochondria as gateways to cerebral preconditioning?// Neuropharmacology. 2008. — 55 (3). — P.334–344.
9. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. Cerebrovasc Dis. 2008; 25 (5): 457–507. doi: 10.1159/000131083.
10. Glasscock G.F., Gelber S.E., Lemson C., et al. Pituitary control of growth in the neonatal rat: effects of neonatal hypophysectomy on somatic and organ growth, serum insulin-like growth factors (IGF) -I and II levels, and expression of IGF binding proteins // Endocrinology. 1990. V. 127. P. 1792–1803.
11. Gunnell D., Miller L.L., Rogers I., Holly J.M. ALSPAC Study Team. Association of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein-3 with intelligence quotient among 8- to 9-year-old children in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. Pediatrics. 2005 Nov; 116 (5): e681–6.
12. Gorelick P.B. Primary prevention of stroke: impact of healthy lifestyle. Circulation. 2008 Aug 26; 118 (9): 904–6. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.800169.
13. Le Roith D., Werner H., Faria T., et al. Insulin-like growth factor receptors. Implications for nervous system function // Ann. N.Y. Acad. 1993. V. 692. P. 22–32.
14. Yerlikaya E., Fulya A. The Insulin-Like Growth Factor System in the Human Pathology, Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases, Dr. Monica Fedele 2013. ISBN: 978–953–51–1080–4, InTech, DOI: 10.5772/55213. Available from: <http://www.intechopen.com/books/hot-topics-in-endocrine-and-endocrine-related-diseases/the-insulin-like-growth-factor-system-in-the-human-pathology>.

## ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

С.В. РОТАНОВ, А.В. РЕЗАЙКИНА, Л.Ф. ЗНАМЕНСКАЯ  
ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, г. Москва

**Резюме.** В статье представлены результаты изучения содержания фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в сыворотке крови больных псориазом.

Определена выраженная тенденция к увеличению уровня циркулирующего VEGF у больных псориазом по мере нарастания степени тяжести и распространенности кожных проявлений, при тяжелых клинических формах кожных проявлений (экссудативный, пустулезный и эритродермия) и при псориатическом поражении суставов. Доказана зависимость повышения уровня VEGF от длительности заболевания.

Не установлено достоверных доказательств существенного влияния на содержание VEGF в сыворотке крови больных псориазом в зависимости от наличия у них сопутствующих соматических заболеваний и возраста пациентов.

Выявлена разная направленность изменения уровня циркулирующего VEGF на фоне проводившейся терапии.

Результаты исследования позволили установить патогенетическую роль фактора роста эндотелия сосудов в развитии псориатического процесса.

**Ключевые слова:** псориаз, фактор роста эндотелия сосудов, клинические лабораторные исследования.

## VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN PATIENTS WITH PSORIASIS

S.V. ROTANOV, A.V. REZAJKINA, L.F. ZNAMENSKAYA  
Federal State Budgetary Institution "State Scientific Center For Dermatovenereology And Cosmetology",  
Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

**Summary.** In the current paper we present results on studying concentration of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in the blood sera of patients with psoriasis. Level of circulating VEGF in patients with psoriasis clearly tended to elevate in parallel with increasing severity as well as spreading of skin signs in case of severe clinical forms of cutaneous manifestations (exsudative, pustular lesions and erythroderma) as well as psoriatic joint disease. Increased level of VEGF was shown to depend on duration of the disease.

Concomitant somatic diseases and age of patients proved to have no marked impact on the level of VEGF in the blood serum of patients with psoriasis.

Level of circulating VEGF was found to change oppositely during therapeutic interventions.

The results of the study let to uncover a pathogenetic role for VEGF in development of psoriatic process.

**Key words:** psoriasis, Vascular Endothelial Growth Factor, clinical and laboratory assays.

### Данные для корреспонденции

Ротанов Сергей Владимирович, 107076, г. Москва, ул. Короленко, 3, строение 6;  
с.л. тел.: 8 (499) 785-20-58, моб. тел.: 8-916-690-3778, e-mail: rotanov@cnikvi.ru

Фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) – один из членов семейства структурно близких между собой белков, вырабатываемых клетками в ответ на недостаточное поступление кислорода к тканям, был впервые описан доктором N. Ferrara в 1989 году. VEGF обеспечивает создание новых кровеносных сосудов на этапе эмбрионального развития, в увеличивающейся мышечной тка-

ни после спортивных тренировок, а также дополнительных и коллатеральных кровеносных сосудов в травмированных тканях и растущих солидных опухолях, а также при блокировании магистральных сосудов [1–2].

Исследование этого фактора и внедрение в клиническую практику препаратов, влияющих на экспрессию гена VEGF, методов генной терапии, активно началось

при изучении онкологических заболеваний, патологии сосудов сетчатки глаз при сахарном диабете и заболеваний сердечнососудистой системы, в частности, у пациентов с инфарктом миокарда [2–5].

Сосудистый эндотелиальный фактор роста представляет собой семейство из 6 основных белков: VEGF-A, -B, -C, -D, -E и PlGF, каждый из которых обладает специфичными биологическими эффектами. Наиболее изученным является VEGF-A, который в организме человека представлен различными изоформами, включающими 121, 145, 165, 189 и 206 аминокислотных остатков; по уровню активности и содержанию доминирует изоформа VEGF-145 с молекулярной массой 46 кДа. Существующие варианты белка VEGF образуются путем альтернативного сплайсинга мРНК одного гена [2, 4]. VEGF синтезируется разными клетками организма, включая опухолевые клетки и макрофаги.

Протеин VEGF обладает способностью увеличивать проницаемость малых кровеносных сосудов: капилляров и венул, что может приводить к накоплению белков плазмы крови (фибрина) в тканях. Экспрессия VEGF регулируется гипоксией путем индуцирования плейотропных реакций, позволяющих эндотелиальным клеткам пролиферировать, мигрировать за пределы сосудистой стенки, собираться в трубки и формировать связанную капиллярную сеть от уже существующих сосудов, выживать и усиливать свою проницаемость [5, 6]. Эндотелиальные клетки участвуют в таких разнообразных процессах, как вазоконстрикция и вазодилатация, презентация антигенов. Кроме того, VEGF подавляет образование дендритных клеток, необходимых для осуществления клеточного иммунного ответа, стимулирует хемотаксис моноцитов [7, 8].

VEGF влияет на развитие кровеносных и лимфатических капилляров (ангиогенез) и выживание незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка), связываясь и активируя в качестве лиганда с близкими по строению тирозинкиназными рецепторами, расположенными на клеточной стенке эндотелиальных клеток: Flt-1 (VEGF R1) и Flk-1/KDR (VEGF R2). Рецептор второго типа — Flk-1/KDR — является наиболее значимым для осуществления всего спектра действия. Уровень его экспрессии значительно увеличивается в пролиферирующих эндотелиальных клетках и снижается при переходе в стадию покоя. Напротив, экспрессию рецептора первого типа, Flt-1/KDR, иммунологически определяют как в покоящихся, так и в активированных клетках эндотелия. Связывание VEGF с этими рецепторами запускает сигнальный каскад, который в конечном итоге стимулирует рост и деление эндотелиальных клеток сосуда, их выживание и пролиферацию, образование новых кровеносных капилляров [1–4, 9, 10]. Рецептор VEGF R-3 экспрессируется преимущественно клетками эндотелия лимфатических сосудов. Взаимодействуя с этим рецептором, изоформы VEGF-C и VEGF-D осуществляют регуляцию лимфангиогене-

за — процесса, влияющего на способность опухоли к метастазированию [1–4, 9].

Неопухолевый ангиогенез *de novo* наблюдается, в частности, при псориазе. При этом заболевании отмечена усиленная экспрессия VEGF и его рецепторов, оказывающих влияние на улучшение трофики псориазической бляшки, дальнейшее ее увеличение и развитие локального воспаления. Блокирование VEGF или его рецепторов VEGF-B, VEGF-C и VEGF-D (например, моноклональными антителами) тормозит развитие воспаления, прекращает локальную пролиферативную активность. Это означает, что антиангиогенные факторы вносят существенную коррекцию в течение воспалительной реакции. Еще одно доказательство важности антиангиогенной терапии при псориазе получено при исследовании механизма действия ретиноидов. Жирорастворимые витамины традиционно используются для лечения псориаза, известен механизм их антипсориазического действия. Ретиноиды становятся биологически активными в результате взаимодействия с соответствующими ядерными рецепторами: рецепторами ретиноевой кислоты либо ядерным фактором транскрипции AP-1. Интересно, что в промоторной области гена VEGF имеются четыре AP-1-связывающих сайта; взаимодействие ретиноидов с AP-1 блокирует экспрессию VEGF, т. е. ретиноиды обладают анти-AP-1 и, следовательно, анти-VEGF-активностью [11–14].

Имеются данные о наличии прямой корреляционной связи уровня циркулирующего протеина VEGF с тяжестью клинических проявлений псориаза у детей ( $r = 0,53$ ), возрастом ( $r = 0,78$ ) и отсутствии связи с формой заболевания [15].

Необходимость и целесообразность изучения VEGF при псориазе обоснована также тем, что гиперпролиферация кератиноцитов и развитие иммунного воспаления во многом связаны с цитокинами, в частности, с фактором некроза опухоли (ФНО- $\alpha$ ), который у части пациентов определяется в повышенном количестве, у части — в низких концентрациях [16]. Известно, что в больших концентрациях ФНО- $\alpha$  активирует проапоптотические (рецептор-опосредованные) сигнальные каскады, то есть останавливает процессы клеточного деления и вызывает физиологическую гибель клеток. Однако в малых дозах этот же цитокин функционирует как фактор выживания и пролиферации, так как происходит активация циклооксигеназы-2 — основного фермента, участвующего в биосинтезе простагландинов, в результате чего активируется ядерный фактор NF- $\kappa$ B, который включает экспрессию генов многих факторов роста, в том числе и VEGF. Последний, кроме участия в ангиогенезе, наряду с другими факторами роста, еще и стимулирует клеточное деление [17, 18].

Целью настоящей работы явилось изучение уровня VEGF в сыворотке крови больных псориазом с учетом тяжести и длительности заболевания.

## Материалы и методы

Уровень VEGF был изучен в сыворотке крови 49 пациентов с псориазом в возрасте от 19 до 72 лет. Среди них было 18 женщин и 31 мужчина. Длительность заболевания у них варьировала от 2,5 месяца до 59 лет. Легкую степень тяжести и распространенности кожных проявлений (PASI < 10) наблюдали у 6, среднюю (10 ≤ PASI < 20) — у 30, тяжелую (PASI ≥ 20) — у 13 пациентов. В 8 случаях наряду с поражением кожи был диагностирован псориатический артрит. У 35 пациентов имелась сопутствующая соматическая патология, у 14 она отсутствовала.

Контрольную группу составили 10 практически здоровых добровольцев в возрасте от 23 до 27 лет.

Количественное содержание VEGF в сыворотке крови пациентов определяли в твердофазном иммуноферментном анализе с использованием набора реагентов «Human VEGF» (Kit № KHG 0112/0111) фирмы «BioSource International, Inc.» (США) с применением аппарата для автоматического промывания иммунологических планшетов марки «PW40» фирмы «Bio-Rad» (США) и спектрофотометра марки «Multiskan Ascent» фирмы «Thermo Labsystems» (Финляндия).

Образцы венозной крови непосредственно после получения подвергали первичной сепарации на лабораторных центрифугах в течение 10 минут при скорости вращения ротора 3000 тысяч оборотов в минуту. Весь объем выделенной сыворотки крови (не менее 300–450 мкл) переносили в маркированные вторичные пластиковые пробирки с крышками типа «эппендорф» и помещали в низкотемпературный морозильник (минус 75–80 °С) до проведения лабораторного изучения.

Перед исследованием обеспечивали оттаивание образцов в течение 1 часа при комнатной температуре в неподвижном состоянии; повторное замораживание оттаявших образцов не допускалось. Для проведения дополнительных исследований использовали новые пробирки из числа сохранявшихся в низкотемпературной морозильной камере.

## Результаты и обсуждение

Проведенные клинические лабораторные исследования показали, что содержание VEGF в сыворотке крови лиц, больных псориазом, колебалось в весьма широком интервале значений: от 36,0 до 2111,7 пг/мл, средний показатель составил 392,05 ± 68,2 пг/мл. В контрольной группе уровни изучаемого фактора варьировали в меньшем интервале: от 0 до 387,8 пг/мл, среднее значение показателя составило более низкое значение — 125,97 ± 41,96 пг/мл (p < 0,05). Следовательно, у пациентов основной группы в сыворотке крови определялся достоверно более высокий уровень VEGF: он был в 3,1 раза больше у больных псориазом, чем у лиц контрольной группы.

У пациентов с псориазом при наличии сопутствующих соматических заболеваний уровень VEGF опреде-

ляли в среднем в пределах 441,2 ± 84,6 пг/мл, а при ее отсутствии — 347,8 ± 95,0 пг/мл (p > 0,05). Полученные данные показали, что наличие сопутствующей патологии существенного влияния на содержание VEGF в сыворотке крови больных псориазом не оказывало.

Не было установлено наличия корреляционной связи между возрастом пациентов и уровнем VEGF в периферической крови (r = 0,081).

Количество циркулирующего VEGF у пациентов с псориатическим артритом выявлено в пределах 505,2 ± 123,7 пг/мл, у больных псориазом без псориатического артрита — 396,97 ± 77,0 пг/мл (p > 0,05), то есть достоверной разницы между установленными значениями определено не было. Однако у пациентов с псориазом при наличии псориатического артрита средний уровень VEGF в сыворотке крови отмечался в 1,3 раза выше аналогичного показателя у больных с псориазом без проявлений артрита.

Изучение результатов проведенных исследований позволило выявить, что у пациентов с тяжелой степенью тяжести псориаза содержание VEGF было увеличено в 2,9 раза (636,6 ± 190,0 пг/мл) по сравнению со средним показателем, определенным у пациентов с легкой (220,6 ± 96,2 пг/мл; p > 0,05), и в 1,8 раза (362,0 ± 52,7 пг/мл; p > 0,05) — со средней степенью тяжести заболевания. Таким образом, уровень VEGF у пациентов с псориазом имел выраженную тенденцию к увеличению по мере нарастания степени тяжести и распространенности кожных проявлений: у больных с тяжелыми формами псориаза он был повышен почти в 3 раза по сравнению с показателем, полученным у больных с легкой степенью тяжести поражения кожи.

Анализ результатов исследования уровня VEGF с учетом характера кожных проявлений показал, что у 12 пациентов, страдавших экссудативным псориазом (9 человек), эритродермией и пустулезным псориазом (3 человека), количество VEGF составило 551,5 ± 173,2 пг/мл, а у 35 пациентов с вульгарным псориазом — 365,4 ± 52,4 пг/мл (p > 0,05), то есть достоверного отличия в содержании цитокина установлено не было в зависимости от клинической формы псориаза. При этом очевидна тенденция к увеличению уровня VEGF (в 1,5 раза) в сыворотке крови у пациентов с более тяжелыми кожными проявлениями псориаза при экссудативной, пустулезной формах и эритродермии по сравнению с пациентами с вульгарным псориазом.

Уровень VEGF в сыворотке крови больных псориазом достоверно зависел от длительности заболевания. Так, у 14 пациентов, страдавших псориазом в течение 2,5 месяца — 5 лет, среднее количество VEGF составляло 276,1 ± 57,5 пг/мл, в то время как у 33 пациентов, болевших псориазом свыше 5 лет, оно определялось на уровне 473,91 ± 77,76 пг/мл (p < 0,05).

Повторное определение содержания VEGF, проведенное у 15 пациентов через 10–14 дней после начала лечения, установило разную направленность выявлен-

ных изменений. У 7 пациентов с исходными показателями VEGF в пределах 160–670 пг/мл на фоне проводившейся терапии наблюдали понижение его содержания на 10–30%, в то время как у других 8 пациентов с исходными уровнями цитокина в пределах 45–620 пг/мл после начала терапии определяли его повышение на 10–50%.

Таким образом, у больных псориазом наблюдали появление в циркулирующей крови повышенного количества белкового продукта, относящегося к группе цитокинов — факторов роста эндотелия сосудов. Морфологические признаки поражения сосудов при псориазе включают усиленную извилистость сосудов сосочкового слоя дермы и расширение базального слоя (папилломатоз), что на гистологических препаратах проявляется увеличением количества сосудов в сосочках дермы. При псориазе происходит увеличение протяженности капиллярной петли, обусловленное повышенной проницаемостью сосудов, пролиферацией эпителиоцитов, вырабатывающих эпидермальный ангиогенный фактор, обструкцией венозных капилляров с развитием тканевой гипоксии и механическим растяжением сосочков дермы [19]. Следовательно, в очагах поражения в коже больных псориазом развиваются условия для образования повышенного количества VEGF и его попадания в циркулирующую кровь, а также воздействия на чувствительные к нему рецепторы клеток.

### Заключение

У больных псориазом определяется достоверно повышенное количество циркулирующего VEGF с достаточно широкой вариабельностью индивидуальных значений по сравнению со здоровыми лицами. Содержание этого цитокина значительно увеличивается у пациентов с длительностью заболевания свыше 5 лет.

Обнаружение циркулирующего VEGF с выраженной тенденцией к увеличению его уровня у больных псориазом с тяжелой степенью выраженности и распространенности кожных проявлений и/или с псориатическим поражением суставов, по сравнению с его содержанием у пациентов с легкой или средней степенью тяжести и распространенности высыпаний, без вовлечения в патологический процесс суставов, а также достоверное различие содержания VEGF в зависимости от длительности заболевания позволяет признать его патогенетическую роль в развитии псориатического процесса.

### Литература

1. Данные сайта НАБИ: <http://www.nabi.ru>
2. Шмонин А.А., Мельникова Е.В., Власов Т.Д. Эндогенная защита при ишемическом повреждении мозга // Медлайн-экспресс. 2011; 1 (207): 46–51.
3. Aberg D., Jood K., Blomstrand C., Jern C., Nilsson M., Isgaard J., Aberg N.D. Serum IGF-I levels correlate to improvement of functional outcome after ischemic stroke // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2011 Jul; 96 (7): E1055–64. doi: 10.1210/jc.2010-2802.
4. Bach L.A., Hsieh S., Sacano K.I. et al. Binding of mutants of human insulin-like growth factor II to insulin-like growth factor proteins 1–6 // Biol. Chem. 1992; 258: 9246–9254.
5. Blundell T.L., Bedarkar S., Humbel R.E. Tertiary structures, receptor binding and antigenicity of insulin-like growth factors // Fed. Proceedings. 1983; 42: 2592–2597.
6. Clemmons D.R., Jones J.J., Busby W.H., Wright C. Role of insulin-like growth factor binding proteins in modifying IGF action // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1993; 692: 10–21.
7. De Smedt A., Brouns R., Uyttenboogaart M., De Raedt S., Moens M., Wilczak N., Lijckx G.J., De Keyser J. Insulin-like growth factor I serum levels influence ischemic stroke outcome // Stroke. 2011 Aug; 42 (8): 2180–5. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.600783.
8. Dirnagl U., Meisel A. Endogenous neuroprotection: mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? // Neuropharmacology. 2008; 55 (3): 334–344.
9. European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. Cerebrovasc Dis. 2008; 25 (5): 457–507. doi: 10.1159/000131083.
10. Glasscock G.F., Gelber S.E., Lemson C. et al. Pituitary control of growth in the neonatal rat: effects of neonatal hypophysectomy on somatic and organ growth, serum insulin-like growth factors (IGF)-I and II levels, and expression of IGF binding proteins // Endocrinology. 1990; 127: 1792–1803.
11. Gunnell D., Miller L.L., Rogers I., Holly J.M. ALSPAC Study Team. Association of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein-3 with intelligence quotient among 8- to 9-year-old children in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children // Pediatrics. 2005 Nov; 116 (5): e681–6.
12. Gorelick P.B. Primary prevention of stroke: impact of healthy lifestyle // Circulation. 2008 Aug 26; 118 (9): 904–6. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.800169.
13. Le Roith D., Werner H., Faria T. et al. Insulin-like growth factor receptors. Implications for nervous system function // Ann. N.Y. Acad. 1993; 692: 22–32.
14. Yerlikaya E., Fulya A. The Insulin-Like Growth Factor System in the Human Pathology, Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases, Dr. Monica Fedele 2013. ISBN: 978-953-51-1080-4, InTech, DOI: 10.5772/55213. Available from: <http://www.intechopen.com/books/hot-topics-in-endocrine-and-endocrine-related-diseases/the-insulin-like-growth-factor-system-in-the-human-pathology>.

## МАРКЕРЫ ОБМЕНА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В ДИАГНОСТИКЕ И ОЦЕНКЕ ИНТЕНСИВНОСТИ РОСТА МИОМЫ МАТКИ

А.Х. ПОПОВА<sup>2</sup>, С.Н. ЛУНЕВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГБУ «Городская больница № 2», г. Курган

<sup>2</sup> ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» МЗ РФ

**Резюме.** В представленном исследовании изучена концентрация продуктов деградации органического матрикса соединительной ткани у 78 женщин с миомой матки в возрасте от 32 до 55 лет. Обнаружено значительное увеличение концентрации глюкуроновых кислот и глюкозаминов в локальном (маточная вена) и системном (локтевая вена) кровотоке пациенток с миомой матки. Показано, что интенсивность накопления глюкуроновых кислот имеет прямую зависимость от скорости роста миомы и длительности заболевания.

**Ключевые слова:** соединительная ткань, миома матки, глюкуроновая кислота, гликозамингликаны, диагностика.

## METABOLIC MARKERS OF CONNECTIVE TISSUE USED IN DIAGNOSTICS AND EVALUATION OF GROWTH INTENSITY OF UTERINE FIBROID

A.H. POPOVA<sup>2</sup>, S.N. LUNEVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State-Funded Institution “City Hospital N 2”

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institution “Russian Research Center “Restorative Traumatology And Orthopedics” Named After G.A. Ilizarov”, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

**Summary.** Here we studied concentration of degradation products of organic matrix released from connective tissue in 78 patients with uterine fibroid, aged between 32–55 years. Substantially increased concentrations of glucuronic acids and glycosamines were detected both in local (uterine veins) and systemic (ulnar veins) bloodstream of patients with fibroids. We have showed that intensity of accumulation of glucuronic acids was directly related to the fibroid growth rate as well as duration of disease.

**Key words:** connective tissue, uterine fibroid, glucuronic acid, glycosaminoglycans, diagnostics.

### Данные для корреспонденции

Попова Альфия Хамитовна, врач акушер-гинеколог гинекологического отделения 2-й городской больницы 640014, Курган, ул. Карбышева, 27, тел. (3522) 23-44-32, e-mail: kur-gb2@rambler.ru

Лунева Светлана Николаевна, проф., д. б. н., руководитель клинико-экспериментального лабораторного отдела ФГУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия»

им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития, e-mail: office@ilizarov.ru

640014, Курган, ул. М. Ульяновой, 6, тел. (3522) 45-05-38, факс (3522) 45-40-60, e-mail: S\_Luneva@mail.ru

Эффективность проведения лечебных мероприятий у женщин с миомой матки во многом определяется точностью диагностики этого заболевания. В настоящее время для диагностики и оценки динамики роста данной опухоли широко используются различные методы исследования [1–4]. Однако большинство оцениваемых диагностических признаков в гинекологической практике выражаются качественными показателями, поэтому из множества клинических, лабораторных и инструментальных признаков необходимо извлекать те, которые могут стать ключевыми для понимания клинической ситуации и достаточными для решения конкретной диагностической задачи [5]. В этом плане наибольший интерес вызывает поиск тех диагностических критериев, которые позволяют не столько диагностировать миому, сколько прогнозировать и оценивать характер ее роста и возможные исходы лечения [6]. Возможности лабораторных методов

для реализации этих задач, на наш взгляд, недостаточно изучены, хотя их перспективность в диагностике миом отмечена в ряде работ [7, 8]. Целью настоящего исследования было изучение возможности использования показателей сыворотки крови и суточной мочи для диагностики и оценки интенсивности роста миомы матки.

### Материалы и методы

На базе Курганской городской больницы № 2 Кургана были обследованы 78 женщин, госпитализированных по поводу миомы матки. Возраст пациенток составил от 32 до 55 лет. Средний возраст первичного выявления миомы матки составлял  $34,4 \pm 2,0$  года, длительность заболевания колебалась от 4 до 10 лет. На проведение клинических исследований получено разрешение комитета по этике при ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ.

В работе изучали изменения биохимических показателей в системном и местном кровотоке, для чего у всех обследуемых пациенток производили забор крови венепункцией локтевой и маточной вены в период операции. Дополнительно исследовали суточную мочу, которую собирали в течение суток до операции. В сыворотке крови пациенток определяли концентрацию продуктов деградации органического матрикса соединительной ткани: силовых (СК), глюкуроновых (ГУК) кислот и гексозаминов (ГА). В суточной моче определяли содержание оксипролина (ОП), сиаловых, уроновых кислот и гексозаминов.

Концентрацию сиаловых кислот в биологических жидкостях определяли наборами реагентов фирмы «Силотест 100» (СПб). Концентрацию уроновых кислот определяли тиобарбитуровым методом, гексозаминов — с реактивом Эрлиха после гидролиза в соляной кислоте. Содержание оксипролина в моче находили по реакции Эрлиха, после солянокислого гидролиза в запаянных ампулах.

В качестве группы сравнения нами были изучены аналогичные биохимические показатели 30 практически здоровых женщин (без гинекологической патологии) в возрасте от 30 до 50 лет.

Результаты лабораторного исследования представляли в виде средней арифметической (М) и стандартного отклонения (SD). Оценку достоверности отличий между двумя группами проводили с применением непа-

раметрического W-критерия Вилкоксона для несвязанных выборок. Корреляционную зависимость между выборками, подчиняющимися нормальному распределению, оценивали по критерию Пирсона, не подчиняющимся закону распределения — по критерию Спирмена.

### Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования мы изучили изменения биохимических показателей сыворотки крови и мочи у пациенток в зависимости от длительности заболевания (табл. 1). Результаты сравнивали с показателями группы сравнения (практически здоровые женщины), которые были разбиты по возрастам, соответствующим среднему возрасту пациенток с конкретной давностью заболевания.

Нами обнаружено, что концентрация СК в локтевой вене у пациенток со сроком заболевания до 4 лет, от 5–6 лет и более 7 лет была значимо выше значений возрастной нормы. В свою очередь уровень СК в маточной вене, наоборот, практически во всех группах от нормы не отличался и был снижен относительно концентрации СК в системном кровотоке (локтевая вена). Динамика содержания СК в суточной моче обследованных пациенток статистически значимо относительно возрастных норм не отличалась и от давности заболевания не зависела.

Самой показательной явилась динамика изменения ГУК в биологических жидкостях пациенток. Во-первых, концентрация ГУК в системном и локальном кровенос-

**Таблица 1. Биохимические показатели сыворотки крови и мочи у пациенток с миомой матки в зависимости от длительности заболевания**

Давность заболевания	До 4 лет	До 5 лет	До 6 лет	До 7 лет	Более 7 лет
Средний возраст	34,0 ± 1,7	37,9 ± 1,1	43,1 ± 1,4	48,1 ± 1,4	53,7 ± 3,4
СК <sub>лв</sub>	2,09 ± 0,11*	1,93 ± 0,34	2,29 ± 0,17*	2,09 ± 0,26	2,24 ± 0,22*
СК <sub>мв</sub>	<b>1,77 ± 0,02</b>	<b>1,41 ± 0,26*</b>	<b>1,71 ± 0,40</b>	1,76 ± 0,33	<b>1,79 ± 0,44</b>
СК <sub>лвн</sub>	1,60 ± 0,12	1,95 ± 0,14	2,10 ± 0,19	1,94 ± 0,21	1,97 ± 0,20
СК <sub>м</sub>	0,62 ± 0,49	0,51 ± 0,20	0,81 ± 0,20*	0,65 ± 0,39	0,64 ± 0,32
СК <sub>мн</sub>	0,57 ± 0,19	0,55 ± 0,18	0,56 ± 0,19	0,58 ± 0,20	0,56 ± 0,17
ГУК <sub>лв</sub>	5,57 ± 2,34*	5,91 ± 2,03*	5,87 ± 1,90*	6,24 ± 1,74*	5,95 ± 1,84*
ГУК <sub>мв</sub>	5,95 ± 1,82*	7,76 ± 2,16*	<b>8,11 ± 2,74*</b>	<b>8,93 ± 2,45*</b>	<b>9,74 ± 2,73*</b>
ГУК <sub>лвн</sub>	1,94 ± 0,56	2,20 ± 0,78	2,25 ± 0,91	2,08 ± 0,82	2,22 ± 0,74
ГУК <sub>м</sub>	5,09 ± 1,73*	2,21 ± 0,98	2,92 ± 1,24	3,38 ± 2,25	2,41 ± 1,13
ГУК <sub>мн</sub>	3,32 ± 1,10	3,35 ± 0,95	3,62 ± 1,12	3,71 ± 1,23	3,66 ± 1,33
ГА <sub>лв</sub>	10,22 ± 2,86*	11,36 ± 1,76*	11,42 ± 1,85*	11,06 ± 3,93*	11,52 ± 2,89*
ГА <sub>мв</sub>	9,31 ± 0,93*	9,35 ± 1,84*	9,78 ± 1,90*	9,79 ± 2,96*	9,81 ± 1,55*
ГА <sub>лвн</sub>	5,64 ± 0,51	6,12 ± 0,84	6,45 ± 0,99	6,79 ± 1,14	7,11 ± 1,74
ГА <sub>м</sub>	1,75 ± 0,64*	1,44 ± 0,56	1,43 ± 0,57	1,35 ± 0,62	1,55 ± 0,61
ГА <sub>мн</sub>	0,77 ± 0,10	0,98 ± 0,23	1,10 ± 0,34	1,14 ± 0,31	1,38 ± 0,52
ОП <sub>м</sub>	0,67 ± 0,51*	0,51 ± 0,39*	0,32 ± 0,09*	0,35 ± 0,11*	0,56 ± 0,12*
ОП <sub>мн</sub>	0,12 ± 0,04	0,18 ± 0,09	0,20 ± 0,06	0,16 ± 0,04	0,17 ± 0,06

*Примечание:* лв — локтевая вена, мв — маточная вена, н — соответствующая возрастная норма, м — моча; \* — достоверные отличия с возрастной нормой при  $p \leq 0,05$ ; **полужирным** выделено — отличие показателя, измеренного в маточной вене, от значений показателя для локтевой вены при  $p \leq 0,05$ .

ном русле обследованных пациенток была значительно повышена относительного уровня этого метаболита у здоровых сверстниц. Во-вторых — с увеличением срока давности заболевания закономерно увеличивалась и концентрация ГУК в маточной и локтевой венах. При этом уровень данного метаболита в маточной вене всегда был выше, чем в локтевой вене, в частности, такие достоверные отличия обнаруживаются у пациенток с длительностью заболевания до 6 и более лет. В-третьих — уровень суточной экскреции ГУК был максимально повышен у пациенток с давностью заболевания до 4 лет, тогда как в другие сроки концентрация этого метаболита в моче соответствовала возрастной норме. Для концентрации ГУК в системном кровотоке отмечено наличие достоверной прямой корреляционной зависимости с длительностью заболевания:  $r = 0,73$  ( $p = 0,05$ ).

Определенное сходство с динамикой ГУК отмечалось и для динамики ГА в крови и моче пациенток. Так, концентрация этого метаболита у пациенток с разными сроками давности заболевания превышала возрастную норму в среднем в 2 раза. При этом, однако, в отличие от ГУК, уровень ГА в системном кровотоке был всегда выше его значений в маточной вене, хотя эти отличия были и не достоверны. Экскреция ГА, также как и для ГУК, была выше нормы только у пациенток с давностью заболевания не более 4 лет.

Экскреция оксипролина у обследованных пациенток была достоверно выше соответствующей возрастной нормы вне зависимости от длительности заболевания.

Для дальнейшего сопоставления полученных данных биохимического исследования с темпами роста миомы мы рассчитали, что у обследованных пациенток рост

миомы в среднем за год составил 0,17–0,18 см. В таблице 2 приведены результаты сравнительного анализа изменений изученных биохимических показателей в зависимости от интенсивности прироста миомы за пятилетний интервал.

Результаты, представленные в таблице 2, демонстрируют, что после 39 лет рост миомы в процентном отношении снижался, хотя по абсолютным значениям рост опухоли продолжался до 44 лет. Такие расхождения связаны с тем, что расчет процента прироста проводится по отношению к предшествующим размерам миомы, поэтому высокие значения абсолютного прироста, пересчитанные в процентах к увеличивающейся опухоли, оказываются сниженными. Интенсивность же прироста биохимических показателей, представленных в таблице, имеет значительные колебания, поэтому из всех данных хотелось бы выделить два наблюдения. Первое — увеличение большинства биохимических показателей приходилось на период 40–44 лет, когда абсолютные значения прироста опухоли в среднем были максимальны. Второе: корреляционный анализ между концентрацией изученных биохимических показателей и размерами миомы выявил, что прямые достоверные значения коэффициента корреляции обнаружены для ГУК системного кровотока (локтевая вена)  $r = 0,81$  ( $p = 0,05$ ), для ГУК в маточной вене  $r = 0,87$  ( $p = 0,04$ ), для ГА системного кровотока  $r = 0,72$  ( $p = 0,05$ ), для ГА в маточной вене  $r = 0,92$  ( $p = 0,02$ ).

Среди обследованных пациенток нами была выделена группа ( $n = 5$ ) с быстрым ростом миомы, результаты биохимического исследования которой были сравнены с показателями пациенток с обычным ростом опухоли

**Таблица 2. Прирост значений биохимических показателей у обследованных пациенток в зависимости от роста миомы в различные возрастные периоды**

Срок наблюдения	35–39 лет	40–44 года	45–49 лет
<b>Прирост миомы (см)</b>	<b>0,70 /</b>	<b>+0,77 /</b>	<b>+0,59 /</b>
<b>Относительный рост</b>	<b>+17%</b>	<b>+15%</b>	<b>+10%</b>
СКЛВ	–8%	+19%	–9%
СКМВ	–20%	+20%	+3%
СКМ	–18%	+59%	–20%
СКМН	–4%	+2%	+4%
ГУКЛВ	+6%	–1%	+28%
ГУКМВ	+30%	+5%	+10%
ГУКМ	–57%	+32%	+16%
ГУКМН	+3%	+5%	+2%
ГА лв	+11%	+1%	–3%
ГА мв	+1%	+5%	0%
ГА м	–18%	–1%	–6%
ГА мн	+27%	+12%	+4%
ОП м	–24%	–59%	+17%
ОП мн	+50%	+11%	–20%

*Примечание:* лв — локтевая вена, мв — маточная вена, н — соответствующая возрастная норма, м — моча.

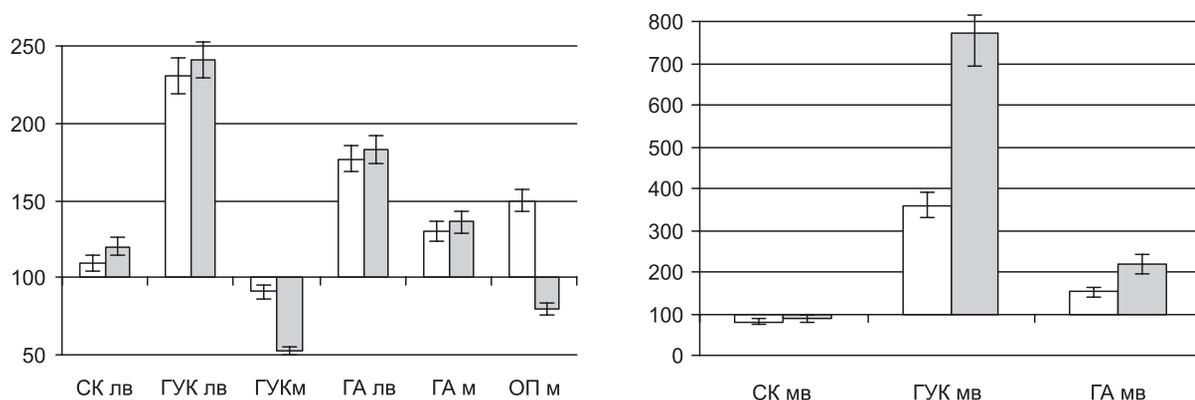


Рис. 1. Концентрация продуктов обмена органического матрикса соединительной ткани у пациенток с обычным (ОР) и быстрым (БР) ростом миомы матки.

Примечание: по оси ОХ — процент относительно возрастной нормы. Нижние индексы на графиках: лв — локтевая вена, м — моча, мв — маточная вена.

(рис. 1). Нами обнаружено, что содержание ГУК и ГА в маточной вене у пациенток с быстрым ростом опухоли в разы превышал как значения возрастной нормы, так и показания, отмеченные у пациенток с обычным ростом миомы (в 8 и 2 раза соответственно). При этом, однако, значительного увеличения концентрации данных метаболитов в системном кровотоке у пациенток с быстрым ростом опухоли, относительно пациенток с обычным ростом миомы, не обнаружено. Мало того, экскреция ГУК у женщин с быстро растущей миомой была снижена почти в два раза, тогда как у пациенток без аномалий в росте миомы концентрация ГУК в моче была выше нормы. Такое наблюдение говорит о том, что резкое увеличение содержания ГУК в кровотоке за счет быстро растущей опухоли в достаточной степени компенсировалось благодаря элиминации данного метаболита печенью.

### Заключение

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что увеличение концентрации продуктов деградации органических компонентов межклеточного матрикса в локальном кровотоке у пациенток с миомой матки свидетельствует о том, что рост миомы сопровождается глубокой дезорганизацией соединительной ткани, в основе которой лежат распад белков и деполимеризация протеогликанов, что ведет к деструкции ее основного вещества и волокон, сопровождающейся резким повышением проницаемости ткани.

Нарушение структурно-функциональных свойств соединительно-тканых компонентов, несомненно, является одним из основных факторов, способствующих росту и развитию миомы. В связи с этим определение продуктов деградации соединительной ткани, таких как ГУК и ГА, в системном кровотоке может являться маркером не только наличия, но роста миомы. Однако, на наш взгляд, определение ГУК в крови более информативно, чем определение ГА. Это связано с тем, что концентрация ГУК подвержена более значительным изме-

нениям в зависимости от стадии развития миомы. Следовательно, определение ГУК в сыворотке крови может быть использовано: 1) для диагностики миомы (наряду с другими методами!), на что указывает пятикратное повышение показателя относительно соответствующей возрастной нормы; 2) для оценки длительности заболевания (уровень ГУК находится в прямой зависимости от давности заболевания); 3) для оценки интенсивности роста миомы (значительное увеличение ГУК в сыворотке крови в динамике наблюдения пациенток с миомой свидетельствует об увеличении скорости ее роста).

### Литература

1. Морозова Е.Б. и др. Взаимосвязь между субпопуляционным составом лимфоцитов, полиморфизмом матриксных коллагеназ и типом роста при миоме матки // Медицинская иммунология. 2005; 2–3: 188.
2. Буянова С.Н. и др. Возможности современных УЗ-технологий в определении клинко-патогенетического варианта миомы // Российский вестник акушера-гинеколога. 2007; 5: 36–38.
3. Буянова С.Н. и др. Клиническое значение оценки показателей внутриопухолевого кровотока в диагностике эстроген- и прогестеронзависимой миомы матки // Российский вестник акушера-гинеколога. 2006; 3: 42–45.
4. Леваков С.А. Дифференциальная диагностика объемных образований матки и яичников при помощи эхографии и компьютерной томографии с построением гистограмм // Акушерство и гинекология. 1997; 1: 61–63.
5. Новикова Е.И., Родионов О.В., Фролов М.В. Оценка состояния больных с опухолями матки и яичников на основе кластерного и дискриминантного анализа // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. 2006; 2: 364–366.
6. Новикова Е.И., Родионов О.В., Фролов М.В. Разработка решающих правил для прогнозирования диагноза опухолей матки и яичников // Вестник Воронеж. гос. техн. ун-та. 2006; 7: 27–30.
7. Алексеева М.Л. и др. Опухолевые маркеры в гинекологии // Акушерство и гинекология. 1995; 5: 35–37.
8. Торчинов А.М., Умаханова М.М., Исаев А.К., Муртазаев А.М. Современные методы диагностики доброкачественных опухолей и опухолевидных образований яичников // Актуальные вопросы практической медицины. М.: РГМУ, 2000: 253–263.

**ПРЕДИКТИВНОЕ ЗНАЧЕНИЕ МАРКЕРОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПРИ РАКЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА**

**Р.К. ДИБИРОВ<sup>1</sup>, С.И. КУТУКОВА<sup>1</sup>, А.И. ЯРЕМЕНКО<sup>1</sup>, Н.Н. ХРОМОВ-БОРИСОВ<sup>1, 2, 3</sup>**

<sup>1</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

<sup>2</sup> Российский НИИ травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена

<sup>3</sup> НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

*Резюме.* Работа посвящена выявлению наиболее значимых биологических маркеров клеточного цикла, характеризующих поведение опухоли, с целью прогноза клинического течения опухолевого процесса, и индивидуализации схем лечения для каждого пациента.

*Ключевые слова:* плоскоклеточный рак, методы прогнозирования, иммуногистохимические маркеры, предиктор, ROC-анализ.

**PREDICTIVE ROLE OF CELLULAR CYCLE MARKERS IN ORAL MUCOSA CANCER**

**R.K. DIBIROV<sup>1</sup>, S.I. KUTUKOVA<sup>1</sup>, A.I. YAREMENKO<sup>1</sup>, N.N. KHROMOV-BORISOV<sup>1, 2, 3</sup>**

<sup>1</sup> First Pavlov State Medical of Saint-Petersburg

<sup>2</sup> Russian R.R. Vreden Scientific research institute of traumatology and orthopedics

<sup>3</sup> D.O. Ott Scientific Research Institute of obstetrics and gynecology, North-West Department of Russian Academy of Medical Sciences

*Summary.* The article is devoted to diagnosis of most significant cellular cycle biological markers which characterize tumor behavior. The investigation is aimed on clinical course prognosis in patients with tumors and individualization of the treatment schemes.

*Key words:* squamous cell carcinoma, methods of prediction, immunohistochemical markers, predictor, ROC-analysis.

**Данные для корреспонденции**

Кутукова Светлана Игоревна к. м. н., доцент кафедры хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ПСПбГМУ имени акад. И. П. Павлова  
197022, Санкт-Петербург, улица Льва Толстого, 6/8, телефон +7-921-995-25-05

Актуальной проблемой онкологии является изучение предиктивного значения молекулярно-генетических тестов, которые могут использоваться для ранней диагностики и прогнозирования течения заболевания у больных со злокачественными опухолями разного генеза и локализации [1, 3, 5, 6, 11, 10, 12]. К числу таких опухолей, характеризующихся прогрессирующим ростом, тяжело-

ми функциональными нарушениями, быстро приводящими к гибели больного при отсутствии адекватного лечения, относится плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта (СОПР). Заболеваемость населения России раком СОПР имеет тенденцию к росту (табл. 1), а смертность в течение первого года после верификации диагноза составляет около 40% [9, 13].

**Таблица 1. Абсолютное число впервые в жизни установленных диагнозов рак слизистой оболочки полости рта в России в 2000–2010 гг. [13]**

Локализация	Годы										
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Полость рта	<b>Мужчины</b>										
	5048	4890	4677	4774	4748	4663	4819	4860	5067	5236	5251
	<b>Женщины</b>										
	1542	1579	1584	1593	1719	1716	1660	1938	1875	1973	2106

**Цель исследования**

Изучить связь между уровнем экспрессии ряда маркеров и клиническим течением рака СОПР, оценить их прогностическое значение.

**Материал и методы исследования**

*Объект исследования* — 100 больных раком слизистой оболочки полости рта, которым проводилось комплексное лечение в клиническом онкологическом диспансере Санкт-Петербурга.

Помимо традиционной микроскопии окрашенных препаратов биоптата, у них проводили исследование следующих иммуногистохимических маркеров.

1. Ядерный белковый комплекс Ki-67, характеризующий пролиферативную потенцию опухоли.
2. Цистеиновая протеаза каспаза (cysteine-dependent aspartate specific protease), caspase 3, характеризующая апоптотическую активность.
3. Перекрестно-комплементирующий фермент эксцизионной репарации ERCC1 (excision repair cross-complementing), характеризующий потенцию репаративной регенерации поврежденной ДНК.

Индекс маркеров вычисляли как соотношение площади специфически окрашенных ядер к площади всех ядер, выраженное в процентах — в относительных единицах — о.е.

В каждой группе проведен анализ уровня экспрессии генов белков Ki-67, caspase-3 и ERCC1.

На первом этапе статистического анализа оценивали значения коэффициентов корреляции между уровнями экспрессии перечисленных маркеров и некоторыми клинико-морфологическими параметрами рака СОПР. На втором этапе исследования проводили ROC-анализ, т.е. анализ с использованием кривых операционной характеристики (ROC – Receiver Operating Characteristic).

**Результаты исследования**

При ROC-анализе нами установлено пороговое значение (точка отсечения) уровня экспрессии caspase 3 в первичном исследовании биоптата для оптимального распознавания пациентов с вероятным возникновением рецидива — **4 о.е.** (рис. 1).

Было установлено, что у больных раком СОПР при уровне экспрессии caspase 3 в первичном биоптате ниже 4 о.е. вероятность возникновения рецидива опухоли высокая. При уровне экспрессии caspase 3 равном или выше 4 о.е. вероятность рецидива рака СОПР низкая.

Интегральным показателем эффективности и информативности результатов ROC-анализа является показатель, обозначаемый как AUC (Area Under Curve — площадь под ROC-кривой). Значение AUC = 0,5 является

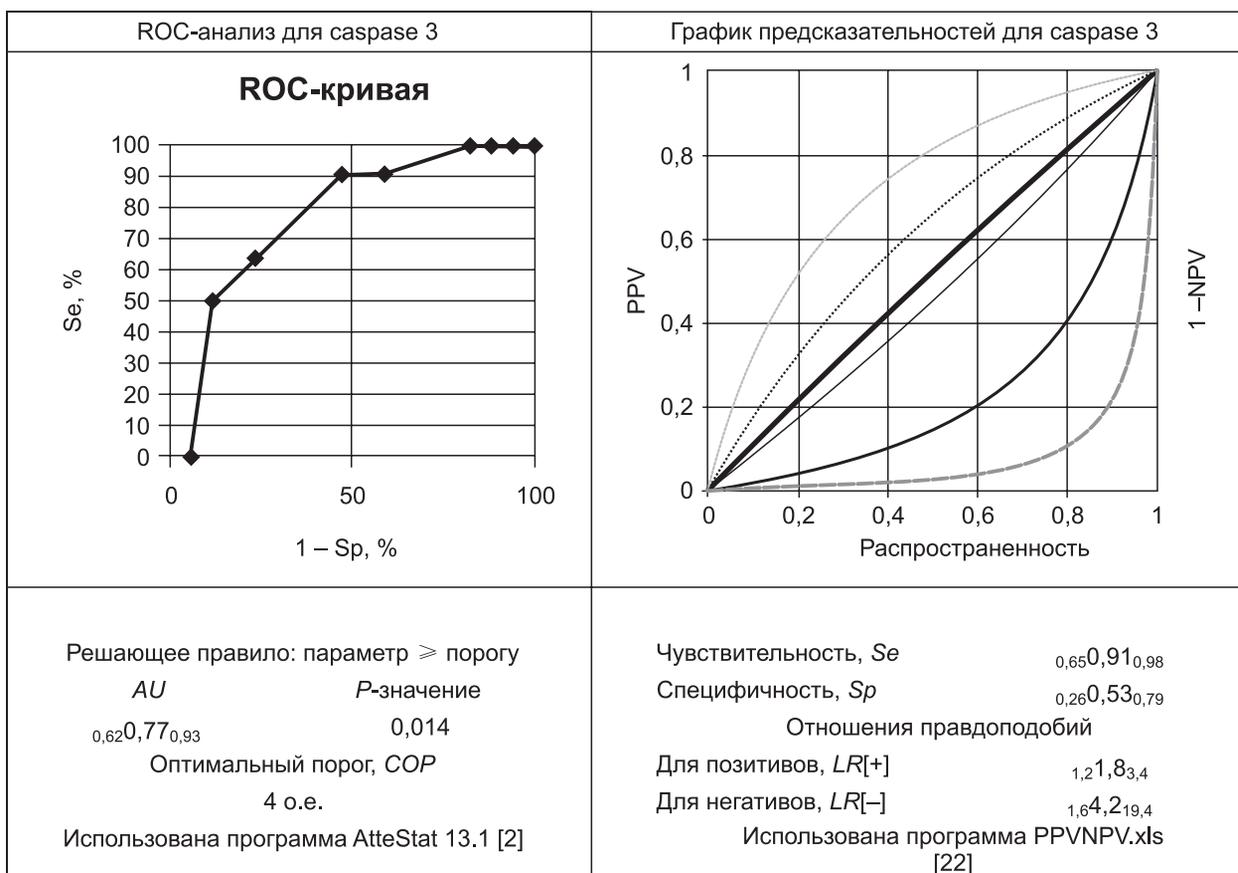


Рис 1. ROC-кривая для полученных данных об уровне экспрессии caspase 3

абсолютно неинформативным. Оптимальным является диагностический тест, для которого  $AUC = 1$ . Чем более выпуклой является ROC-кривая на графике, тем выше информативность диагностического теста – способность распознавать наличие или отсутствие опухоли. При значениях  $AUC$  от 0,7 до 0,8 эта способность интерпретируется как хорошая, от 0,8 до 0,9 – как очень хорошая, от 0,9 до 1,0 – как отличная. В наших исследованиях этот показатель составил  $AUC = 0,77$  с 95%-м ДИ от 0,62 до 0,93. Клиническая интерпретация этого показателя такова. Если обследовать двух больных (одного с рецидивом, а другого без рецидива рака СОПР), то с вероятностью от 62% до 93% у больного с рецидивом опухоли уровень экспрессии caspase 3 в первичном биоптате окажется более низким, чем у больного без рецидива.

Основными показателями эффективности и информативности предлагаемого теста являются чувствительность  $Se$ , специфичность  $Sp$ , отношения правдоподобий для положительных  $LR [+]$  и отрицательных  $LR [-]$  результатов теста, предсказательные вероятности для положительных  $PPV$  и отрицательных  $NPV$  результатов теста [8].

Полученное значение чувствительности оказалось довольно высоким:  $Se = 0,650,910,98$ . Однако значение специфичности для данного биомаркера следует считать малоинформативным:  $Sp = 0,260,530,79$ .

Значения отношений правдоподобий для положительных  $LR [+]$  и отрицательных  $LR [-]$  результатов теста оказались равными, соответственно:  $LR [+]$  = 1,21,83,4 и  $LR [-]$  = 1,64,219,4. Указанные ДИ не покрывают неинформативные значения  $LR [+]$  = 1 и  $LR [-]$  = 1. Следовательно, они статистически значимо отличаются от этих неинформативных значений. Полученное значение  $LR [+]$  = 1,21,83,4 свидетельствует о том, что после получения у больного положительного результата теста (< 4 о. е.) шансы возникновения у него рецидива повышаются примерно в 2 раза по сравнению с шансами возникновения рецидива у больного, у которого уровень экспрессии caspase 3 в первичном биоптате не был определен.

Полученное значение  $LR [-]$  = 1,64,219,4 свидетельствует о том, что после получения отрицательного результата теста (> 4 о. е.) шансы отсутствия (неразвития) рецидива у такого пациента повышаются примерно в 4 раза по сравнению с шансами отсутствия рецидива у пациента, у которого уровень экспрессии caspase 3 в первичном анализе не определяли.

С использованием ROC-анализа нам удалось выявить пороговое значения экспрессии для фермента ERCC1, участвующего в репаративной регенерации поврежденной ДНК клетки (рис. 2).

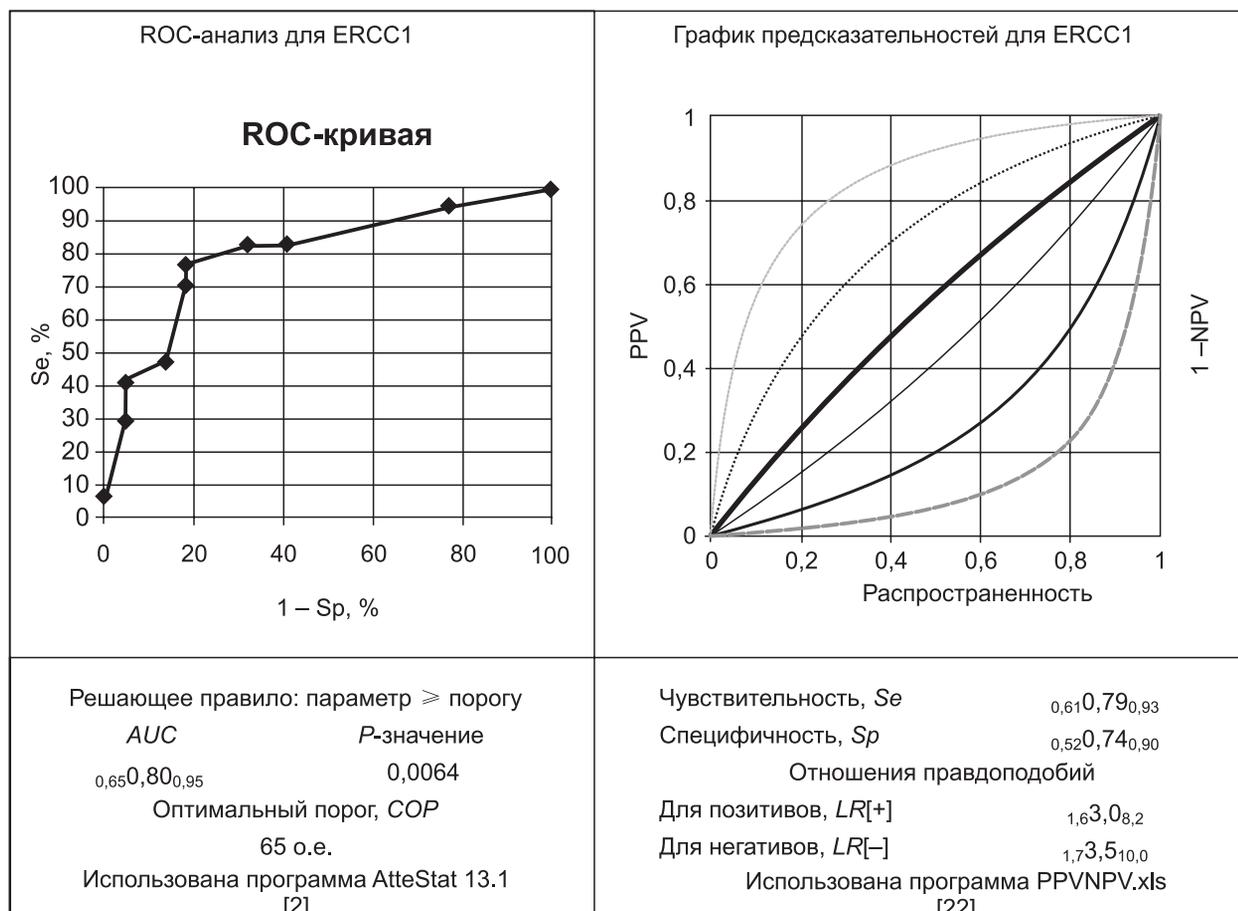


Рис. 2. ROC-кривая для полученных данных об уровне экспрессии ERCC1

Пороговым оказалось значение 65 о.е. Нами было установлено, что если у больного раком СОПР уровень экспрессии ERCC1 в первичном биоптате превышает этот порог, то с большой вероятностью у него можно ожидать возникновение рецидива опухоли. При уровне экспрессии ERCC1 в первичном биоптате, равном или ниже этого порога, вероятность возникновения рецидива опухоли у него не высокая.

Интегральный показатель составляет  $AUC = 0,650,800,95$  с 95%-м ДИ, качество данной модели можно оценивать как очень хорошее. Клиническая интерпретация этого показателя может быть следующей. Если обследовать двух больных (одного с рецидивом, а другого без рецидива рака СОПР), то с вероятностью от 65% до 95% у больного с рецидивом опухоли уровень экспрессии ERCC1 в первичном препарате будет более высоким, чем у больного без рецидива.

Полученные значения чувствительности и специфичности оказались довольно высокими:  $Se = 0,610,790,93$ ,  $Sp = 0,520,740,90$ .

Значения отношений правдоподобий для положительных  $LR [+]$  и отрицательных  $LR [-]$  результатов теста получились, соответственно,  $LR [+]$  = 1,63,08,2 и  $LR [-]$  = 1,73,510,0. Указанные ДИ не покрывают информативные значения  $LR [+]$  = 1  $LR [-]$  = 1. Следовательно, они статистически значимо отличаются от этих информативных значений. Полученное значение  $LR [+]$  = 1,63,08,2 свидетельствует о том, что после получения у пациента положительного результата теста (> 65 о.е.) шансы возникновения у него рецидива повышаются примерно в 3 раза по сравнению с шансами возникновения рецидива у пациента, у которого уровень экспрессии ERCC1 при первичном анализе не был определен.

Полученное значение  $LR [-]$  = 1,73,510,0 свидетельствует о том, что после получения отрицательного результата теста (< 65 о.е.) шансы отсутствия (неразвития) рецидива у такого пациента повышаются примерно в 3,5 раза по сравнению с шансами отсутствия рецидива у пациента, у которого уровень экспрессии ERCC1 не определяли.

## Вывод

На основании анализа результатов проведенного исследования нами было установлено следующее:

1. У больных раком СОПР при уровне экспрессии caspase 3 в первичном биоптате ниже 4 о.е. вероятность возникновения рецидива опухоли высокая; при уровне экспрессии caspase 3, равном или выше 4 о.е., вероятность рецидива рака СОПР низкая.
2. С использованием ROC-анализа установлено пороговое значение экспрессии для фермента ERCC1, участвующего в репаративной регенерации поврежденной ДНК клетки. Оно оказалось равным 65 о.е.

Высокая активность данного фермента обуславливает быстрое восстановление опухолевых клеток после повреждения их ДНК препаратами платины. Поэтому при высокой экспрессии фермента ERCC1 в первичном биоптате у больных раком СОПР высока вероятность развития рецидива опухоли после химиотерапии.

## Литература

1. Арсенин С.Л. Молекулярно-биологическая диагностика в онкологии // Клиническая лабораторная диагностика. 2006; 10: 25–32.
2. Гайдышев И.П. Статистика в публикациях // Гений ортопедии. 2005; 4: 155–161. Электронная версия: <http://sourceforge.net/projects/attestat>.
3. Герштейн Е.С., Овчинникова Л.К., Терешкина И.В., Дигаева М.А., Тулеуова А.А. Лабораторные и клинические перспективы исследования молекулярных маркеров опухолей (обзор) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2010; 4: 3–10.
4. Имянитов Е.Н. Молекулярная диагностика в онкологии // Молекулярная биология. 2008; 42; 5: 772–785.
5. Коган Е.А., Жак Г., Кайзер У. и др. Иммуногистохимия биомолекулярных маркеров рака легкого // Архив патологии. 1997; 6: 23–30.
6. Кутукова С.И., Маныхас Г.М., Яременко А.И., Божор С.С. Роль опухолевых маркеров и других клинико-лабораторных показателей в прогнозировании рецидивирования плоскоклеточного рака головы и шеи // Материалы XIV Российского онкологического конгресса. Москва, 2010: 260–261.
7. Соловьев М.М. Рак слизистой оболочки полости рта и языка (резервы улучшения результатов лечения) // Практическая онкология. 2003; 4; 1: 31–35.
8. Федотенко С.П. Злокачественные эпителиальные опухоли головы и шеи. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / под ред. Н.И. Переводчиковой. М.: Практическая медицина, 2005: 182–195.
9. Тишков А.В., Хромов-Борисов Н.Н., Комашня А.В., Марченко Ф.Ю., Семенова Е.М., Эюбова Н.И., Делакова Е.А., Быхова А.В. Статистический анализ таблиц 2x2 в диагностических исследованиях. СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2013: 20 с.
10. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность) М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2012: 4–25.
11. Brennan J.A., Mao L., Hruban R.H., Boyle J.O., Eby Y.J., Koch W.M. et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck // N. Engl. J. Med. 1995; 332: 429–435.
12. Cortesina G., Martone T. Molecular metastases markers in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature // Acta Otolaryngologica Ital. 2006; 26: 317–325.
13. Couture C., Raybaud-Diogene H., Tetu B. et al. p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma [Text] // Cancer. 2002; 94 (3): 713–722.
14. Eckardt A., Barth E.L., Kokemueller H., Wegener G. Recurrent carcinoma of the head and neck: treatment strategies and survival analysis in a 20-year period // Oral. Oncol. 2004; 40; 4: 427–432.
15. <http://medicine.cf.ac.uk/primary-care-public-health/resources>.

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ТЕСТОВ ПРИ ПАТОЛОГИИ ПАРОДОНТА

А.Б. ЧУХЛОВИН, А.И. ЯРЕМЕНКО

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

**Резюме.** Настоящий обзор посвящен эволюции лабораторных методов в пародонтологии, исходя из концепции комплексного характера патогенеза пародонтитов, включающего диссеминацию патогенной микрофлоры в составе биопленок, реактивное воспаление десен, разрушение соединительнотканых структур десен, зубов и альвеол. Разработка новых способов диагностики, оценки риска развития и эффективности лечения заболеваний пародонта должна включать в себя анализ микробных сообществ, а также маркеров воспаления, деструкции соединительной ткани и остеопороза.

**Ключевые слова:** пародонтит, микробы, биоценоз, маркеры воспаления, деструкция десен, утрата костной ткани.

## PERSPECTIVES OF DEVELOPING NOVEL LABORATORY ASSAYS FOR PATIENTS WITH DISEASES OF PARADONTIUM

A.B. CHUHLOVIN, A.I. YAREMENKO

First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg

**Summary.** Present review article concerns current evolution of laboratory approaches in periodontology, taking into account variable and complex reasons of periodontitis, including dissemination of pathogenic microflora within biofilms, as well as reactive gingival inflammation, destruction of connective gingival tissue, teeth and alveoli. Development of new approaches to diagnostics, risk evaluation and treatment efficiency in periodontal diseases should include further analysis of microbial communities, as well as markers of inflammation, connective tissue destruction and osteoporosis.

**Key words:** periodontitis, microbial biocenosis, inflammatory markers, gingival destruction, alveolar bone loss.

### 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 Минздрава России; 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6/8, тел./факс: +7 (812) 499-71-94, e-mail: alexei.chukh@mail.ru

### Введение

В основе пародонтитов (как острых, так и хронических) лежит прогрессирующая атрофия соединительной ткани, прежде всего — костной основы зубных альвеол. Имеются многочисленные факторы, способствующие развитию пародонтита: возрастные нарушения соединительной ткани, образ жизни, генетические факторы и, не в последнюю очередь, — инфекционный процесс, вызываемый микрофлорой ротовой полости.

Одной из предпосылок для костно-деструктивного процесса является зубной налет, содержащий разнообразные бактерии. В результате жизнедеятельности этих бактерий развивается зубной камень, образуются десневые карманы, с углублением которых возникает подвижность пораженных зубов.

Соответствующие оценочные клинические индексы имеют диагностический характер и основаны, прежде

всего, на выявлении признаков местной кровоточивости, утраты костной основы десен и усиления подвижности зубов. В то же время желательны разработка и внедрение биологических маркеров, имеющих прогностическое значение на ранних стадиях болезненного процесса.

### Краткая история вопроса

Накопление знаний о причинах микробных заболеваний зубов и пародонта в XX веке происходило в соответствии с развитием методик лабораторной диагностики. Сто лет назад в распоряжении ученых были, главным образом, методы микроскопии и культивирования микроорганизмов.

Прежде всего, с начала микробиологической эры проводился поиск возможных возбудителей кариеса, особенно в детском возрасте, и был показан повышенный

риск развития кариеса в связи с колонизацией зубных дефектов *Streptococcus mutans* и бактериями рода *Lactobacillus* [1]. Однако до сих пор не выяснена патогенетическая роль этих и других микроорганизмов в инициации и развитии данной патологии.

В 1920-х годах при исследовании ротовой и десневой жидкости у больных с пародонтитами (тогда это состояние именовали *pyorrhea alveolaris*) были обнаружены различные виды спирохет, фузиформных бактерий и стрептококков, которым приписывали определенную этиологическую роль [2]. Число таких потенциально патогенных микроорганизмов стремительно росло. Тем не менее, ввиду отсутствия явных связей с клинической патологией пародонта, роль инфекции в течение десятилетий считали вторичной по отношению к механическим факторам, вызывающим атрофию десен и костной ткани зубных альвеол, — таким как раздражение пародонта, нарушения прикуса, другие конституциональные дефекты зубного аппарата [3]. При этом, однако, коррекционное или профилактическое лечение больных не давало четко выраженного клинического результата.

В 60-х гг. XX века появились данные о том, что образование зубных бляшек (зубного камня) у человека часто приводит к развитию гингивита и впоследствии — к патологии пародонта и утрате альвеолярной костной ткани [4]. Исходя из теории о «неспецифической» роли зубного камня в патологии пародонта были разработаны методы лечения, направленные на удаление зубного камня (бляшек). Но позже выяснилось, что во многих случаях рост зубного камня не сопровождается деструкцией пародонта, и, напротив, тяжелый периодонтит у ряда больных наблюдается на фоне минимальных отложений [2]. В те же годы в опытах на экспериментальных животных была показана способность ряда стрептококков и актиномицетов вызывать пародонтит [5], что возродило интерес к роли инфекционного фактора в возникновении и развитии данного заболевания.

Внедрение новых методов световой и электронной микроскопии в 70-х годах XX века позволило уточнить спектр микроорганизмов в зубных отложениях у больных пародонтитами, гингивитами и здоровых лиц [6]. В отличие от нормальных образцов, где преобладали Грам-положительные кокки, у лиц с пародонтитами были обнаружены большие количества Грам-негативных бактерий и подвижных форм микроорганизмов, при выраженном разнообразии микрофлоры в пораженных участках. Так возникла теория «специфической» (инфицированной) зубной бляшки.

Исследование спектра микробов, ассоциированных с пародонтитами, стало возможным благодаря внедрению новых методов анаэробных культур, селективных ростовых сред и более точной дифференциации отдельных видов микроорганизмов. В 70–80-х годах среди множества бактерий удалось выявить те виды, которые регулярно и в больших количествах были представлены в локальных образцах (зубных отложениях и десневой

жидкости) при острых и хронических воспалениях пародонта. Так, вполне доказана патогенетическая роль *Actinobacillus actinomycetemcomitans* — Грам-негативной палочки, способной проникать в эпителий десен и обладающей выраженными цитотоксическими свойствами. Другой патогенный микроорганизм, также способный разрушать клетки эпителия, — *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* — регулярно выделяется в культуре при деструктивных формах пародонтитов. Внимание исследователей было также обращено на *Bacteroides forsythus* (ныне именуемую *Tannerella forsythensis*), которая наиболее часто обнаруживается в глубоких десневых карманах и ассоциирована с утратой костной основы при тяжелых пародонтитах. В целом, чем более глубокими становятся десневые карманы, тем более анаэробной становится поддесневая эндогенная микрофлора, и тем больше возникает сложностей с ее культивированием.

Наряду с перечисленными микробами, рассматривается возможное участие *Treponema denticola* в развитии клинической патологии пародонта. Среди других потенциально патогенных видов микробов актуальны, в частности, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius* и *Capnocytophaga spp* [3]. Методические проблемы здесь связаны, прежде всего, с их плохой культивируемостью даже в специализированных питательных средах.

#### Микробиота полости рта и молекулярно-биологические подходы к ее изучению

К настоящему времени известно более 500 отдельных видов микроорганизмов, населяющих зубодесневую область. Большинство из них неспособно к росту *in vitro*. Их выживание и размножение обеспечивается за счет тесных межклеточных взаимодействий в структуре зубного камня или поддесневых масс. Эти сообщества микроорганизмов существуют в виде биопленок (biofilms) на поверхности десен и зубов. Пространственная организация таких бактериальных комплексов и специфичность межвидовых взаимодействий описана в ряде работ [7]. Эта точка зрения обоснована, в частности, в работах отечественных ученых [8]. Многие бактерии и грибы способны эффективно колонизовать поверхность слизистых полости рта и зубов. Сосуществование микробов в составе биопленок обеспечивает возможность взаимодействия генетической информацией, в частности — плазмидами лекарственной устойчивости, что приводит к повышенной антибиотикорезистентности при лечении патологии пародонта. Кроме того, симбиоз микрофлоры в биопленках затрудняет выделение чистых клинических изолятов для микробиологических исследований.

В этой ситуации наиболее приемлемым является анализ спектра геномных бактериальных ДНК, выделенных из биологического образца, например, десневой или ротовой жидкости, который осуществляется с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции

ДНК (ПЦР), часто — с уточняющей ДНК-гибридизацией.

В качестве примера полной классификации пародонтопатогенов приводим перечень условных комплексов микроорганизмов периодонта, определяемых группой Socransky в рамках развернутой ДНК-диагностики [10].

**«Красный»:** *T. orsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* (ассоциирован с глубиной десневого кармана и кровоточивостью десен).

**«Оранжевый» (предшествует колонизации бактериями «красного комплекса»):** *C. gracilis*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *F. nucleatum ss nucleatum*, *F. nucleatum ss polymorphum*, *F. nucleatum ss vincentii*, *F. periodonticum*, *P. micra*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *S. constellatus*.

**«Желтый» (стрептококки):** *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*.

**«Зеленый»:** *A. actinomycetemcomitans*, *C. gingivalis*, *C. ochracea*, *C. sputigena*, *E. corrodens*.

**«Пурпурный»:** *A. odontolyticus*, *V. parvula*.

**Актиномицеты:** *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. oris*.

**Другие:** *E. saburreum*, *G. morbillorum*, *L. buccalis*, *N. mucosa*, *P. acnes*, *P. melaninogenica*, *S. anginosus*, *S. noxia*, *T. socranskii*.

В работах последних лет Socransky et al. с помощью этой панели для ДНК-диагностики исследовали среднее содержание 40 видов бактериальной ДНК в поддесневых биопленках, взятых от лиц со здоровым периодонтом и у больных с агрессивным пародонтитом [10]. Наибольшее превышение над контролем было отмечено для *P. gingivalis* и *T. forsythensis*, что предполагает существенную роль этих бактерий в эволюции пародонтитов.

Работы других авторов также подтверждают клиническое значение этих микроорганизмов, которые могут быть маркерами наличия процесса и, возможно, его тяжести. Помимо *P. gingivalis* и *T. forsythensis*, к ним относят также *A. actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola* и микробы рода *Prevotella*. Соответствующие ДНК-зонды часто включаются в стандартные панели для ДНК-диагностики пародонтопатогенных бактерий [11, 12].

### Молекулярные методы выявления пародонтогенной микрофлоры

Обычно при исследовании представительства ПМ в клинических образцах анализируют микробные маркеры отдельных групп по классификации, предложенной более 20 лет назад [9]. Группа авторов из Бостона (США) применила новый для того времени метод гибридизации ДНК, выделенной из поддесневых зубных бляшек, с набором ДНК-зондов, специфичных для разных микробных видов. Для выявления генетического материала отдельных микробов ДНК-зонды были иммобилизованы на твердом носителе (методика «шахматной доски» — checkerboard). На основании обследования много-

численных образцов от больных пародонтитом и контрольных лиц авторы провели у них качественное и полуколичественное определение 40 видов микроорганизмов, которые считались типичными для заболеваний пародонта. С учетом ассоциаций между наличием отдельных микроорганизмов и патологией пародонта, были выделены пять групп (комплексов) микробов. Из них только «красный» комплекс микроорганизмов был тесно связан с клиническими признаками заболевания пародонта (глубиной десневого кармана и кровотечением при зондировании). Socransky et al. включили в эту группу следующие виды бактерий: *Bacteroides forsythus* (ныне — *Tannerella forsythensis*), а также *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*.

Определение нескольких маркерных микроорганизмов среди широкого спектра геномных бактериальных ДНК, выделенных из биологического образца, например, десневой или ротовой жидкости, возможно с помощью полимеразной цепной реакции ДНК. Чувствительность молекулярно-биологических методов достаточна, чтобы обнаружить 10–100 генокопий целевого микроорганизма в 0,1 мл биоматериала. Поэтому молекулярно-биологический подход (ПЦР-диагностика) является в настоящее время стандартным и эффективным способом оценки разнообразия десневых микробов, который был внедрен в течение последнего десятилетия в практику отечественной стоматологии [13, 14].

Выявление микробных антигенов с помощью специфических моно- или поликлональных антител может быть альтернативой молекулярно-биологической диагностике. Детекция бактериальных антигенов может производиться различными способами, из которых наиболее чувствительными являются иммунофлуоресцентные и иммуноферментные методы. Например, в работе Wolff et al. (1991) [15] использован метод флуоресцентной метки для определения содержания пародонтопатогенов в зубных бляшках. Флуоресцентно-меченые антитела против ЛПС ряда бактерий применили для детекции антигенов в экстрактах клинических образцов. Чувствительность метода составляла  $10^3$ – $10^4$  бактерий. Таким образом, этот метод на порядок менее чувствителен, чем молекулярно-биологическое определение этих же микроорганизмов. Кроме того, учитывая более высокую стоимость специфических антител по сравнению с реагентами для ДНК-диагностики, следует отдать предпочтение молекулярно-биологическим тестам.

### Специфические антимикробные антитела

Вне зависимости от первичных факторов, на фоне роста микробной флоры наблюдается выработка специфических антител. Обычно в исследовательских работах оценивали наличие и уровни антител класса IgG к наиболее распространенным микроорганизмам полости рта. Данные прошлых лет суммированы в работе Lakio et al. (2009) [16], где обсуждается информативность определения специфических антимикробных антител при аг-

рессивных пародонтитах и их меньшая изменчивость при хронических процессах. Указанная работа посвящена долгосрочному (в течение 15 лет) мониторингу IgG-антител к *A. actinomycetemcomitans* и *P. Gingivalis* у 21 добровольца. Оказалось, что уровни специфических антител были весьма стабильными на протяжении всего срока, а их средние титры, как и содержание соответствующей микрофлоры, были достоверно повышены у лиц с пародонтитом. Это и ряд других исследований 1970–1990-х годов указывают на небольшую клиническую информативность определения антител класса IgG к пародонтогенным микробам. Исследование на большом клиническом материале проведено Dye et al. (2009) [17]. Авторы использовали высокопроизводительный метод иммуноблоттинга для определения сывороточных IgG-антител к 19 видам одонтогенных микроорганизмов. При обследовании 5747 взрослых людей в возрасте старше 40 лет с различной выраженностью патологии пародонта показано, что высокие титры антител к *Porphyromonas gingivalis* достоверно коррелировали с наличием пародонтита, с учетом пола, возраста и социальных характеристик обследованных лиц. Однако относительно невысокие уровни полученных различий и наличие антимикробных антител у стоматологически здоровых лиц затрудняют индивидуальную клиническую диагностику, ограничивая определение антимикробных антител, главным образом, эпидемиологическими исследованиями.

#### Аутоиммунные маркеры

Разрушение десневых клеточных структур может приводить к появлению аутоантител у больных. Одним из существенных факторов развития аутоиммунной реакции может быть модификация белков — их «цитруллирование» под действием энзимов одонтогенных бактерий. Так, в работе Wegner et al. (2010) [18] показано уникальное для бактерий полости рта свойство *P. gingivalis* к выработке пептидиларгининдеаминазы — фермента, превращающего аргинин в цитруллин в составе пептида и, тем самым, изменяющего антигенную специфичность белка-мишени (в данной работе — фибриногена и енолазы). Этот механизм признан крайне важным для развития аутоиммунных процессов, например — в развитии ревматоидного артрита.

На фоне вероятных связей между патологией пародонта и аутоиммунными заболеваниями представляет интерес работа Chen et al. (2009) [19]. Обследовали небольшую группу больных с болезнью Бюргера и пародонтитом, определяли аутоантитела к кардиолипину и специфическим эпитопам *P. gingivalis* и *T. denticola*, сходным с белками человека. Частота выявления этих антител существенно повышена по сравнению с контрольной группой, что позволило предположить роль «молекулярной мимикрии» одонтопатогенных и человеческих антигенов в развитии аутоиммунного процесса. Другие аналогичные работы также проводятся, глав-

ным образом, для уточнения связей пародонтальных инфекций с ревматоидным артритом и другими аутоиммунными заболеваниями.

#### Маркеры катаболизма и деструкции соединительной ткани

Наиболее простой интегральный показатель возможного бактериального обсеменения — повышение содержания лактата в биоматериале, что можно определять специальными тест-системами. Так, одна из таких систем (Clinpro Cario™) была испытана в группе детей с различной выраженностью кариеса [20]. Биоматериал забирали со спинки языка, и риск кариеса оценивался по уровням продукции лактата. Однако при оценке многофакторной патологии полости рта этот параметр оказался недостаточно специфичным и чувствительным по сравнению с классическим микробиологическим методом (число лактобацилл в образце).

Так, в качестве специфического показателя разрушения соединительной ткани десен изучался продукт деградации коллагена — модифицированный телопептид коллагена I типа (МТК) — один из маркеров клинического остеопороза. Авторы исследования [21] определяли этот маркер в десневой жидкости у больных с имплантатами зубов и выявили четкую корреляцию между локальными уровнями МТК и наличием патологической микрофлоры (*P. intermedia*, *C. gingivalis*, *F. nucleatum* и *S. gordonii*).

Щелочная фосфатаза (ЩФ) также считается маркером костной патологии, хотя и не очень специфичным [22]. Авторы измеряли активность ЩФ в десневой жидкости у больных до и после SRP-лечения. Выявлено значительное снижение активности ЩФ до нормальных уровней уже через 15 дней лечения. Дальнейшая динамика ЩФ коррелировала с изменениями CAL (clinical attachment level), что, по мнению авторов, свидетельствует о чувствительности этого показателя на различных стадиях воспалительного процесса.

Поэтому определение известных маркеров костной резорбции используется для разработки новых диагностических тестов при пародонтитах. Так, в работе Ramseier et al. (2009) [23] проводилось сравнительное обследование больных с патологией пародонта и здоровых лиц, у которых в образцах ротовой жидкости, наряду с клинической оценкой и определением *P. gingivalis* и *T. denticola*, измеряли содержание провоспалительных цитокинов и маркеров костного метаболизма. матриксных металлопротеиназ (ММР). Наибольшие корреляции с тяжестью пародонтита и инфицированностью *T. denticola* были отмечены для ММР-8 и -9, а также остеопротегерина. Авторы предлагают эти показатели для дальнейших испытаний в качестве прогностических маркеров при патологии периодонта.

В качестве маркеров тяжести пародонтита могут применяться самые различные продукты локальной деструкции клеток. Так, в работе Thaweboon et al. (2010)

[24] исследовали фрагменты генов бета-глобина (длиной 536 п. о. и 2000 п. о.) в десневой жидкости от 40 больных с хроническим пародонтитом, 30 — с гингивитом и 22 клинически здоровых лиц. При этом оказалось, что больные пародонтитом имели наибольшие уровни глобина в супернатанте, а здоровые лица — минимальные его концентрации в образцах. Особо отмечено, что содержание 2-кб фрагмента глобина в осадке было повышено при периодонтите в сравнении с гингивитом. Этот фрагмент глобина отсутствовал у здоровых лиц, что говорит о высокой ценности данного показателя в дифференциальной диагностике.

Корректный отбор информативных маркеров требует многофакторной обработки результатов по многим параметрам, включая клинические наблюдения в течение достаточно длительных сроков для оценки прогностической ценности показателей. В качестве примера можно привести Kinney et al. (2011) [25] при исследовании панели из 14 воспалительных и костно-деструктивных маркеров, а также ДНК-диагностики микробных маркеров в биопленках у 100 человек, наблюдавшихся в течение 12 месяцев. Исследования проводились раз в 2 месяца. Посредством специальных иерархических алгоритмов были выявлены диагностические комбинации отдельных признаков, характеризующие больных с прогрессией заболевания.

### Маркеры воспалительного процесса

По определению, маркеры хронического воспалительного процесса вполне могут быть информативными при заболеваниях полости рта и десен. Поскольку хроническая патология пародонта носит возрастной характер, то она зачастую ассоциирована с другими хроническими состояниями, например, атеросклерозом, при котором также проявляются признаки воспаления. Так, большое популяционное исследование Fedele et al. (2011) [26], проводившееся с участием 17 223 взрослых мужчин и женщин, включало анализ концентраций С-реактивного белка/фибриногена. При этом выяснилось, что наличие патологии слизистой полости рта было ассоциировано с повышенными уровнями С-реактивного белка (OR=1,41). Однако аналогичная связь была показана между патологией полости рта и сердечно-сосудистыми заболеваниями в анамнезе, что ставит под вопрос трактовку авторов.

Определенная информативность определения ИЛ-1-бета в десневой жидкости подтверждена в работе Rescala et al. (2010) [27], где обследовали больных с хроническим и агрессивным пародонтитом. Сопоставление с клиникой, наличием микробов «красного комплекса» и содержанием ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8 и интерферона-гамма показало лишь связь между повышением ИЛ-1-бета и эластазы и глубиной десневых карманов, однако различий по этим параметрам между больными с хроническим и агрессивным течением пародонтита не было выявлено. В то же время, в уже упомянутом исследовании

Teles et al. (2010) [10] отмечены высокие уровни корреляции между наличием бактерий «красного комплекса» у большой группы больных с пародонтитами и концентрациями ИЛ-1 $\beta$ /ИЛ-10, что позволяет считать эти белки маркерами воспаления, сопутствующего микробной инвазии при данной патологии.

Группа финских авторов провела сравнительную оценку ряда показателей в слюне у 84 больных и в контрольной группе [28]. В результате предложена оценка риска развития тяжелого периодонтита на основании 3 маркеров ротовой жидкости — *P. gingivalis*, интерлейкина-1-бета и матриксной металлопротеиназы-8, отражающая, по их мнению, тяжесть периодонтита и пригодная для неинвазивной классификации больных в больших популяционных исследованиях. Аналогичные результаты получены американскими авторами, проводящими исследование эффективности локального применения доксицилина [29], где было показано повышение ИЛ-1-бета и ММР-8 в десневой жидкости по мере прогрессии пародонтита. При этом маркеры деструкции коллагена (содержание коллагеназы и телопептида коллагена типа I) не изменялись, что свидетельствовало о преимущественном противовоспалительном эффекте доксицилина в использованных дозах.

Клиническая значимость определения маркеров острой фазы воспаления показана также в работе из Австралии [30]. Определение данных факторов проводилось у 430 больных пародонтитами и 509 контрольных лиц. При этом обнаружено, что повышенный риск периодонтита был ассоциирован с содержанием С-реактивного белка и ИЛ-1-бета, что еще раз указывает на их клиническую информативность, по крайней мере в больших популяционных исследованиях.

В плане перспективных разработок представляют интерес «нетрадиционные» показатели, например, «молекулы стресса», которые могут быть ассоциированы с воспалительными процессами и определялись в слюне 100 больных с пародонтитами [31]. При этом выяснилось, что содержание молекул стресса (хромогранина А, кортизола, и бета-эндорфина) в ротовой жидкости достоверно коррелировало с клиническими параметрами заболевания пародонта. Авторы предполагают, что психологический стресс может быть фактором, прямо или косвенно способствующим воспалительным процессам пародонта.

### Заключение

Таким образом, роль лабораторной диагностики при пародонтитах состоит в оценке выраженности локальной микробной инфекции у больного. В связи с этим наиболее специфичными тестами в лабораторной диагностике пародонтитов сейчас является молекулярная диагностика маркерных микроорганизмов (ПЦР, как количественная, так и качественная). Учитывая многообразие микробиоты ротовой полости, состоящей из сотен видов микроорганизмов, и зачастую низкую эф-

фективность их культивирования, геноспецифическая ДНК-диагностика представляется наиболее рациональным исследовательским подходом.

Насколько информативно определение наличия патогенных микроорганизмов пародонта в клиническом плане? Проверочные исследования последних лет показывают, что вряд ли эта диагностика достаточно специфична, так как эти же микробы встречаются и у здоровых людей, начиная с молодого возраста [32]. Возможен подсчет видов выявляемых микробов, число которых коррелирует с наличием пародонтита и тяжестью процесса [33].

Несомненно, что впоследствии информативность диагностики существенно возрастет в связи с внедрением количественной ПЦР-диагностики (ПЦР в реальном времени), что позволит установить диагностические (пороговые значения) для клинической патологии пародонта

Тесты на воспаление (определение белков острой фазы – цитокинов, продуктов разрушения клеток в десневой жидкости и слюне) также применимы, хотя они менее специфичны.

В целом, разработка быстрых, легко выполнимых прогностических тестов при патологии пародонта перспективна в плане выявления начальных стадий заболевания, контроля эффективности проводимой терапии и снижения возможных расходов на последующее длительное лечение.

#### Литература

1. Loesche W.J. Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease // Baron S., ed. Medical Microbiology. 4th edition Chapter 99. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. NCBI Bookshelf (a service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health).
2. Socransky S.S., Haffajee A.D. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective // Periodontol. 2000; 1994; 5: 7–25.
3. Feres M., Cortelli S.C., Figueiredo L.C., Haffajee A.D., Socransky S.S. Microbiological basis for periodontal therapy // J. Appl. Oral Sci. 2004; 12 (4): 256–266.
4. Löe H., Theilade E., Jensen S.B. Experimental gingivitis in man // J. Periodontol. 1965; 36: 177–187.
5. Socransky S.S., Hubersak C., Propas D. Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii* // Arch. Oral Biol. 1970; 15: 993–995.
6. Listgarten M.A., Hellden L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans // J. Clin. Periodontol. 1978; 5: 115–132.
7. Zijng V., van Leeuwen M.B.M., Degener J.E., Abbas F., Thurnheer T., Gmur R., Hermie J.M., Harnsen H.J.M. Oral biofilm architecture on natural teeth // PLoS ONE. 2010; 5 (2): e9321. doi:10.1371/journal.pone.0009321
8. Тец В.В. Роль микрофлоры полости рта в развитии заболеваний человека // Стоматология. 2008; 87; 3: 76–80.
9. Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent R.L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque // J. Clin. Periodontol. 1998; 25 (2): 134–144.
10. Teles R.P., Gursky L.C., Faveri M., Rosa E.A., Teles F.R.F., Feres M., Socransky S.S., Haffajee A.D. Relationships between subgingival microbiota and GCF biomarkers in generalized aggressive periodontitis // J. Clin. Periodontol. 2010; 37 (4): 313–323.
11. Riep B., Edesi-Neuß L., Claessen F., Skarabis H., Ehmke B., Flemmig T.F., Bernimoulin J.-P., Goebel U.B., Moter A. Are Putative Periodontal Pathogens Reliable Diagnostic Markers? // J. Clin. Microbiol. 2009; 47 (6): 1705–1711.
12. Leonhardt Å., Carlén A., Bengtsson L., Dahlén G. Detection of Periodontal Markers in Chronic Periodontitis // Open Dent. J. 2011; 5: 110–115.
13. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Носик А.С. Применение молекулярно-генетических систем для диагностики воспалительных заболеваний слизистой оболочки рта и пародонта // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. 2006; 7: 69–73.
14. Чухловин А.Б., Соловьева А.М., Матело С.К., Дмитриев А.В., Морозова Е.Б., Бобров А.П., Толоян А.А. Метод ПЦР-детекции пародонтопатогенных бактерий и *Streptococcus mutans* в биологических образцах из ротовой полости // Клини. лабор. диагн. 2007; 4: 35–38.
15. Wolff L.F., Anderson L., Sandberg G.P., Aeppli D.M., Shelburne C.E. Fluorescence immunoassay for detecting periodontal bacterial pathogens in plaque // J. Clin. Microbiol. 1991; 29 (8): 1645–1651.
16. Lakio L., Antinheimo J., Paju S., Buhlin K., Pussinen P.J., Alftan G. Tracking of plasma antibodies against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* during 15 years // J. Oral Microbiol. 2009; 1: 10. doi: 10.3402/jom.v1i0.1979
17. Dye B.A., Herrera-Abreu M., Lerche-Sehm J., Vlachojannis C., Pikdoken L., Pretzl B., Schwartz A., Papapanou P.N. Serum antibodies to periodontal bacteria as diagnostic markers of periodontitis // J. Periodontol. 2009; 80 (4): 634–647.
18. Wegner N., Wait R., Sroka A., Eick S., Nguyen K.A., Lundberg K., Kinloch A., Culshaw S., Potempa J., Venables P.J. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and O<sub>6</sub>-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. 2010; 62 (9): 2662–2672.
19. Chen Y.W., Nagasawa T., Wara-Aswapati N., Ushida Y., Wang D., Takeuchi Y., Kobayashi H., Umeda M., Inoue Y., Iwai T., Ishikawa I., Izumi Y. Association between periodontitis and anti-cardiolipin antibodies in Buerger disease // J. Clin. Periodontol. 2009; 36 (10): 830–835.
20. Azrak B., Gleissner C., Willershausen B., Jadamus-Stuecker J., Callaway A. Accuracy of a chair-side test for predicting caries risk compared with established methods // Schweiz. Monatsschr. Zahnmed. 2010; 120 (5): 409–414.
21. Oringer R.J., Palys M.D., Iranmanesh A., Fiorellini J.P., Haffajee A.D., Socransky S.S., Giannobile W.V. C-Telopep/tide pyridinoline cross-links (ICTP) and periodontal pathogens associated with endosseous oral implants // Clin. Oral Implants Res. 1998; 9 (6): 365–373.
22. Perinetti G., Paolantonio M., Femminella B., Serra E., Spoto G. Gingival crevicular fluid alkaline phosphatase activity reflects periodontal healing/recurrent inflammation phases in chronic periodontitis patients // J. Periodontol. 2008; 79 (7): 1200–1207.
23. Ramseier C.A., Kinney J.S., Herr A.E., Braun T., Sugai J.V., Shelburne C.A., Rayburn L.A., Tran H.M., Singh A.K., Giannobile W.V. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease // J. Periodontol. 2009; 80 (3): 436–446.
24. Thaweboon B., Laohapand P., Amornchat C., Matsuyama J., Sato T., Nunez P.P., Uematsu H., Hoshino E. Host beta-globin gene fragments in crevicular fluid as a biomarker in periodontal health and disease // J. Periodontol. Res. 2010; 45 (1): 38–44.
25. Kinney J.S., Morelli T., Braun T., Ramseier C.A., Herr A.E., Sugai J.V., Shelburne C.E., Rayburn L.A., Singh A.K., Giannobile W.V.

Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression // J. Dent. Res. 2011; 90 (6): 752–758.

26. Fedele S., Sabbah W., Donos N., Porter S., D'Aiuto F. Common oral mucosal diseases, systemic inflammation, and cardiovascular diseases in a large cross-sectional US survey // Am. Heart J. 2011; 161 (2): 344–350.

27. Rescala B., Rosalem W. Jr, Teles R.P., Fischer R.G., Haffajee A.D., Socransky S.S., Gustafsson A., Figueredo C.M. Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects // J. Periodontol. 2010; 81 (9): 1308–1316.

28. Gursoy U.K., Kononen E., Pussinen P.J., Tervahartiala T., Hyvarinen K., Suominen A.L., Uitto V.J., Paju S., Sorsa T. Use of host- and bacteria-derived salivary markers in detection of periodontitis: a cumulative approach // Dis. Markers. 2011; 30 (6): 299–305.

29. Reinhardt R.A., Stoner J.A., Golub L.M., Lee H.M., Nummikoski P.V., Sorsa T., Payne J.B. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis // J. Periodontol. 2010; 81 (2): 251–259.

30. Fitzsimmons T.R., Sanders A.E., Bartold P.M., Slade G.D. Local and systemic biomarkers in gingival crevicular fluid increase odds of periodontitis // J. Clin. Periodontol. 2010; 37 (1): 30–36.

31. Rai B., Kaur J., Anand S.C., Jacobs R. Salivary stress markers, stress, and periodontitis: a pilot study // J. Periodontol. 2011; 82 (2): 287–292.

32. Толоян А.А., Чухловин А.Б., Соловьева А.М., Смирнова Т.В., Константинова В.Е., Тагалева Л.А., Кобясова И.В., Матело Л.Н., Матело С.К., Носов С.Н., Шаманова Н.А. Эпидемиологическое исследование распространенности периодонтопатогенной микрофлоры полости рта у населения России // Стоматология. 2005; 5: 14–20.

33. Чухловин А.Б., Толоян Арег А., Трофимова Ю.Г., Кобясова И., Морозова Е.Б., Хохлачева А.В., Тепляков Б.Г., Матело С.К., Купец Т.В., Гроссер А.В. Стоматологические проблемы курильщиков и пути их решения // Клин. стоматол. 2007; 2: 56–59.

**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**

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

С.В. ГЕРАСИМОВА, И.М. ХАЕРТЫНОВА

ГБОУ ДПО Казанская государственная медицинская академия Минздрава России

**Резюме.** Установлено, что треть населения планеты инфицирована *M. tuberculosis*. Точное и своевременное выявление туберкулеза является основополагающим для достижения успеха в терапии заболевания и в контроле его распространения. Существующие на сегодняшний день методы диагностики туберкулеза не обладают необходимыми показателями чувствительности и специфичности и, как правило, требуют дорогостоящего оборудования и высококвалифицированных специалистов, либо растянуты во времени до получения результатов исследования. Выявление туберкулеза среди больных ВИЧ-инфекцией сопряжено со значительным снижением показателей диагностической значимости классических клинико-лабораторных методов. В то же время трудно переоценить значимость своевременной диагностики туберкулеза у пациентов с иммунодефицитом. В данной работе представлены результаты обзора существующих на сегодняшний день методов диагностики туберкулеза с указанием их преимуществ и недостатков.

**Ключевые слова.** *Mycobacterium tuberculosis*, диагностика туберкулеза, ВИЧ-инфекция, специфичность, антигены МБТ.

## CURRENT PROBLEMS OF TB DIAGNOSTICS IN HIV PATIENTS

S.V. GERASIMOVA, I.M. HAERTYNOVA

State Budget Educational Institution For Continuing Vocational Education

“Kazan State Medical Academy”, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

**Summary.** Found that a third of the world's population is infected with *M. tuberculosis*. Accurate and timely detection of tuberculosis is fundamental to achieving success in the treatment of disease and in control on its distribution. Currently existing methods for diagnosing tuberculosis do not have adequate sensitivity and specificity, and, as a rule, require expensive equipment and highly skilled professionals, or stretched in time before the results of the study. Detection of tuberculosis among HIV-infected patients is associated with a significant decrease in performance of diagnostic significance of the classical clinical and laboratory techniques. At the same time it is difficult to overstate the importance of timely diagnosis of tuberculosis in immunocompromised patients. This paper presents a review of currently existing methods for diagnosis of tuberculosis, with their advantages and disadvantages.

**Key words:** *M. tuberculosis*, diagnosis of tuberculosis, HIV-infection.

### Данные для корреспонденции

Герасимова Светлана Валерьевна, ассистент и заочный аспирант кафедры инфекционных болезней ГБОУ ДПО КГМА Минздрава России, г. Казань, ул. Муштари, д. 11, тел. раб. (843) 267-80-95, факс (843) 267-80-00, тел. сот. 8 (917) 239-96-97, e-mail: sgerasimova.kgma@gmail.com

Туберкулез (ТБ) продолжает занимать лидирующую позицию среди инфекционной патологии. Треть населения всей планеты инфицирована *M. tuberculosis* [1, 2]. Инфицирование вирусом иммунодефицита человека оказывает добавочное влияние на распространение туберкулеза. На фоне роста числа больных ВИЧ-инфекцией заболеваемость туберкулезом резко повысилась как в эндемичных странах, так и в тех странах, где ранее частота туберкулеза снижалась [1, 3, 4]. Считают, что

вирус иммунодефицита человека, поражая иммунную систему, увеличивает чувствительность к туберкулезной инфекции и повышает риск прогрессирования в активную фазу заболевания. Одновременно туберкулез является лидирующей причиной большинства смертей у больных ВИЧ-инфекцией в стадии вторичных заболеваний [2, 5, 6].

Ведущее место в диагностике ТБ продолжают занимать классические методы, к которым относятся бакте-

риологический, бактериоскопический методы, туберкулинодиагностика и рентген-флюорографическое исследование очагов поражения, которые являются важнейшей составляющей диагностического процесса как на этапе постановки диагноза «туберкулез», так и при контроле эффективности химиотерапии. Однако стоит отметить наличие недостатков в использовании вышеприведенных методов [7]. К таким можно отнести невозможность выявления абациллярных форм ТБ, длительность постановки пробы и низкую чувствительность методов, длительность метода культивирования возбудителя и неоднозначность картины лучевой диагностики при ряде сопутствующих заболеваний [8]. У пациентов с положительным статусом по ВИЧ трудности диагностики ТБ не ограничиваются классическими методами, а возникают и при дополнительных исследованиях такими методами как ПЦР и бактериологический посев (*Bactec*), недостатками которых являются узкая направленность и малая информативность, а также трудность выявления внелегочных форм ТБ [9]. Ниже представлен обзор всех существующих на сегодняшний день методов диагностики ТБ и трудности, возникающие при выявлении последнего у больных ВИЧ-инфекцией.

Недостатком микроскопии является низкая чувствительность метода, в среднем составляющая 50–60% у иммунокомпетентных пациентов и значительно более низкая среди больных ВИЧ-инфекцией [7, 10]. В США *M. tuberculosis* обнаруживаются в мазках мокроты у 31–82% ВИЧ-серопозитивных больных туберкулезом легких, причем чаще у больных с менее выраженной иммуносупрессией и реже у больных с далеко зашедшей стадией ВИЧ-инфекции [11].

Необходимо отметить, что трудность диагностики также обусловлена низкой концентрацией *M. tuberculosis* в мокроте больных сочетанной патологией ВИЧ/ТБ. Как следствие достаточно простой, доступный и относительно быстрый вышеупомянутый способ обнаружения активной формы ТБ дает низкие показатели чувствительности, поскольку минимальная необходимая концентрация микобактерий для надежного обнаружения и идентификации на мл мокроты составляет  $\geq 10^4$  [7, 12, 13]. В исследованиях, в которых для контроля был использован бактериологический метод, показано, что средняя чувствительность микроскопии мазка мокроты по выявлению ТБ легких составила <60% у иммунокомпетентных пациентов и показала значительно более низкие результаты среди больных ВИЧ-инфекцией [7]. Это также подтверждается данными R. W. Shafer, B. R. Edlin (1996) [10], где говорится, что метод микроскопии, который наиболее широко используется для выявления кислотоустойчивых микобактерий, имеет ограниченное значение, так как 50% ВИЧ-позитивных больных туберкулезом дают отрицательный результат. Фактическая чувствительность микроскопии в рабочих условиях может быть значительно ниже.

Проведенный анализ имеющейся литературы в этой области показал возможности для улучшения микроскопического метода исследования клинических образцов (преимуществом микроскопии является то, что он недорогой, относительно быстрый в выполнении, может быть использован повсеместно), который остается наиболее доступным и важным тестом при активной форме ТБ для начала терапии [8]. Данный метод диагностики был усовершенствован применением двух общих альтернатив традиционной прямой микроскопии, которые были приняты для повышения скорости или чувствительности: это флуоресцентная микроскопия и альтернативные методики обработки образцов. Метод микроскопической диагностики с применением флуоресцентной микроскопии сопровождался увеличением чувствительности, в среднем, на 10% без потери специфичности. Однако незначительное улучшение показателя чувствительности также сопряжено с недостатками, которыми являются сложность пробоподготовки, трудоемкость и субъективность анализа [14, 15].

Альтернативные методики заключаются в подборе новых подходов обработки образцов биоматериала, которые могли бы улучшить показатели исследований, безопасность или удобство применения микроскопии [16]. Систематический обзор литературы в этой области определил 83 исследования, посвященных изучению альтернативных методик прямой микроскопии. Большинство исследований, в которых использовались какие-либо процедуры [17], дали увеличение чувствительности от 13% до 33% по сравнению с прямой микроскопией, когда культуральный метод был использован как основополагающий стандарт [18]. К сожалению, исходное разнообразие в выборке пациентов и интерпретации опубликованных исследований не представляют возможности определить, какие, если таковые имеются, из методов являются оптимальными [8].

Выявление микобактерий в крови при отсутствии их в мокроте в 33% случаев является первым признаком ТБ у больных ВИЧ-инфекцией [19, 20]. R. W. Shafer, R. Coldberg, M. Sierra и др. (1989) [21], R. W. Shafer, W. D. Jones (1991) [22], изучавшие вопрос бактериовыделения у больных туберкулезом на фоне ВИЧ-инфекции, у 15% пациентов выявляли микобактерии ТБ методом микроскопии в крови, в 28% случаев высевали из крови. При диссеминированном туберкулезе бактериемия имела место в 83% случаев.

Известно, что бактериологический метод диагностики является «золотым» стандартом диагностики ТБ. Недостатком этого метода является длительность роста культуры, в среднем 6–10 недель. При этом процент положительных результатов не превышает 76% [7, 8]. В результате метод приводит к существенной задержке постановки диагноза и усугублению тяжести течения заболевания. Стоит обратить внимание, что отсроченная диагностика ТБ и задержка начала противотуберкулезной терапии (ПТТ) более чем на 3 недели может при-

вести к летальному исходу 45–85% больных [23]. Таким образом, поиск быстрых и надежных диагностических тестов для выявления активных форм ТБ является актуальной проблемой на сегодняшний день.

По данным В. В. Покровского, О. П. Фроловой, А. В. Кравченко и др. (2002), процент бактериовыделителей среди больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции составил 18,2–36,0%, что связано с уменьшением числа случаев ТБ в фазе распада в этот период. Трудность диагностики ТБ у больных ВИЧ-инфекцией, кроме вышеуказанного, связана с отсутствием МБТ в мокроте и другом отделяемом [24, 25, 26]. В то же время, R. A. Clark, S. L. Blackley, D. Greer и др. (1991) чаще, чем при туберкулезе без ВИЧ-инфекции, встречают бактериомию.

Известно, что для посева диагностического материала используют разнообразные питательные среды, среди которых можно выделить 3 основные группы: плотные питательные среды на яичной основе; плотные или полужидкие питательные среды на агаровой основе; жидкие синтетические и полусинтетические питательные среды [8]. Оптимальная среда для культивирования *M. tuberculosis* должна быть недорогой, простой в приготовлении, состоять из широко доступных компонентов, подавлять рост сопутствующей микрофлоры, обеспечивать хороший рост при засеве небольшого количества микобактерий и возможность предварительной дифференциации выросших колоний по морфологическим признакам [18, 27]. Принципиально новый уровень бактериологической диагностики ТБ был достигнут внедрением в практику автоматизированных систем бульонного культивирования для ускоренного выявления микобактерий BACTEC MGIT 960 (“BectonDickinson”) и MB/VacT (“OrganonTeknika”), позволяющих выявлять рост культуры в диагностическом материале в течение 10–20 дней, с чувствительностью, превышающей стандартный бактериологический метод на среде Левенштейна–Йенсена в среднем на 10% [28].

Следующий способ диагностики ТБ основан на способности микобактериофагов инфицировать и размножаться в жизнеспособных МБТ, что было использовано в диагностических тестах. В одном из них литический *Mycobacteriophage D29* используется для инфицирования микобактериальных туберкулезных палочек в предварительно обработанной мокроте, после короткого инкубационного периода [29, 30]. Эта биологическая амплификационная процедура может быть выполнена в течение нескольких дней, по сравнению с неделями в случае бактериологического метода, и теоретически дает аналогичную чувствительность. Данная методика была разработана в качестве коммерческого анализа FASTPlaqueTB (BiotecLaboratories). На сегодняшний день тест определяет 29–87% случаев ТБ у пациентов с положительными результатами мазка на БК и 13–78% у пациентов с отрицательными результатами микроскопии в течение 2 дней [29, 30, 31, 32].

Известный способ диагностики ТБ, такой как кожная проба с туберкулином, обладает малой информативностью в силу содержания смеси антигенов и, как следствие, перекрестного реагирования с другими видами микобактерий, что не позволяет полагаться на результаты данного теста [7]. Широко применяемая во фтизиатрической практике туберкулинодиагностика изучалась рядом авторов для выявления ТБ у больных ВИЧ-инфекцией. По данным зарубежных и отечественных авторов, туберкулиновая проба оказалась малоэффективной [33, 34, 35, 36].

Внутрикожный диагностический тест — «Диаскин-тест», который на сегодняшний день в России предложен как альтернатива стандартной кожной пробе с туберкулином, основан на комбинации двух рекомбинантных белков (ESAT6/CFP10), которые отсутствуют у вакцинного штамма *M. bovis* BCG и большинства нетуберкулезных микобактерий, за счет чего тест обладает лучшими показателями по чувствительности на 13–15% и специфичности на 30–40% стандартной пробы Манту с 2 ТЕ [37, 38, 39].

Методы молекулярно-генетической диагностики микобактерий ТБ основаны на амплификации нуклеиновых кислот. Три наиболее широко используемых теста на основе этой методики — это полимеразная цепная реакция (ПЦР; RocheDiagnostics), транскрипционно опосредованная амплификация (GenProbe) и последовательность смещающая амплификация (BectonDickinson) — они показали отличную специфичность и скорость детекции, а также хорошую чувствительность [40, 41]. ПЦР дает результаты в течение 1–2 дней, это делает данный метод удобным. Чувствительность этого метода колеблется от 4% до 80%, со специфичностью до 80–100% [42, 43]. Несмотря на явные преимущества молекулярно-генетической диагностики перед другими существующими методами, особенно для быстрой диагностики ВИЧ-ассоциированного ТБ у пациентов с отрицательными результатами микроскопии мазков на *M. tuberculosis*, они ограничены в применении в эндемичных по ТБ регионах, в первую очередь из-за их высокой стоимости и сложности выполнения метода обследования.

### Иммунологические методы в диагностике ТБ

Многие туберкулезные белки и небелковые молекулы высоко иммуногенны [7, 8, 44]. Использование для диагностических целей гуморального и клеточного ответов очень заманчиво, потому что тест на определение иммуноглобулинов и интерферона потенциально прост. Тесты, основанные на иммунологии, теоретически обладают дополнительным преимуществом, поскольку независимы от наличия и доступности инфекционного агента (МБТ) в исследуемом материале. Поэтому определение внелегочного и олигобациллярного течения заболевания также возможно, как и полостного легочного ТБ [8, 45]. Хотя иммунный ответ гетерогенен, антитела к микобактериальным антигенам могут быть

определены у большинства пациентов с активным ТБ [46]. Нарушение гуморального иммунного ответа у пациентов с ВИЧ-ассоциированной иммуносупрессией теоретически приводит к неинформативным результатам. Но, несмотря на общее снижение антительного ответа на ТБ у пациентов с ВИЧ-инфекцией, антитела к некоторым антигенам, таким как ТВ 9.7, ТВ15.3, ТВ16.3, ТВ51 [47]; B81 (88 кДа) [48]; MBR32 [49, 50] и Ag85B (30kDa) [51, 52, 53] могут преимущественно экспрессироваться в ситуации сочетанной патологии ВИЧ/ТБ и иметь специфическую диагностическую и прогностическую значимость у таких пациентов [7].

Иммуносупрессия, связанная с ВИЧ-инфекцией, является наиболее значимым фактором риска для реактивации ТБ у лиц, инфицированных *M. tuberculosis* [9]. Существует два новых перспективных теста (in vitro), основанных на клеточном иммунном ответе. Используют специфические микобактериальные антигены, кодируемые последовательностью ДНК, которые были удалены из всех вакцинных штаммов и не присутствуют в большинстве видов нетуберкулезных микобактерий: это антиген-6 (ESAT-6, Rv3875) и белок-10, находящийся в культуральном фильтрате — (CFP-10, Rv3874), которые отсутствуют в БЦЖ и в большинстве нетуберкулезных микобактерий [54, 55]. Эти белки кодируются в геноме *M. tuberculosis* (геном RD-1). Показано, что в процессе атеннуирования *M. bovis* для получения вакцины БЦЖ RD1-участок был удален. У лиц с латентной микобактериальной инфекцией Т-клетки памяти продуцируют интерферон-гамма (INF) в ответ на воздействие антигенов микобактерий ТБ. Разработанный тест позволяет измерить уровень INF-гамма при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) или при помощи обнаружения INF-гамма-продуцирующих клеток методом ELISPOT [56, 57]. Ряд исследований доказал высокую чувствительность и специфичность определения INF-гамма, как ответную реакцию на специфические антигены МБТ у пациентов с активной формой ТБ [58], также у здоровых людей, не подвергавшихся воздействию микобактерий, и у здоровых лиц, подвергшихся инфицированию *M. tuberculosis*, независимо от их статуса вакцинации БЦЖ. Высокий процент здоровых людей в эндемичных по туберкулезу регионах дают положительный результат на ESAT-6 и CFP-10, что указывает на высокую долю населения с латентной инфекцией [58, 59, 60]. Эти исследования показывают, что ответ на ESAT-6 и CFP-10 является более точным и специфичным, чем кожная проба Манту, для оценки наличия или отсутствия микобактериальной инфекции среди взрослого населения [59, 60]. Также, в отличие от кожного теста, ответы на ESAT-6 или CFP-10 дают возможность дифференцировать активную форму ТБ от первичной вакцинации БЦЖ [59, 61]. Данный метод выявляет латентно-инфицированных лиц на более ранних сроках и полезен для отслеживания контактов и скрининга групп высокого риска в эндемичных районах с низким

уровнем дохода [62, 63]. Однако эти методы не подходят в качестве альтернативы микроскопическому или культуральному методу в странах с низким уровнем дохода, где большая часть населения имеет латентную туберкулезную инфекцию [59].

На сегодняшний день важными являются разработка и внедрение простых диагностических методов, которые будут в короткие сроки определять наличие или отсутствие МБТ, будут широко доступны и не потребуют сложного технологического и технического оснащения, для глобальной борьбы с ТБ [7, 45].

Серологическая диагностика ТБ является перспективным направлением [45, 64, 65].

Вариабельность активности антигенных структур МБТ на разных стадиях инфекционного процесса, наличие у него большого количества антигенов, различная иммуногенность последних служат объективными причинами того, что до настоящего времени не разработано единого серологического теста, обладающего высокой чувствительностью и специфичностью [7, 9]. Однако исследования в данном направлении активно ведутся во многих научных центрах мира. Определение антител к возбудителю ТБ в сыворотке — многообещающий метод диагностики (в частности, иммуноферментный анализ — ИФА), а преимущество его заключается в стандартизации получаемых данных. ИФА позволяет значительно сократить время лабораторного подтверждения клинического диагноза, активно применять его для диагностики внелегочных форм ТБ, особенно ценен он для диагностики ТБ у детей (трудности со сбором мокроты, множественные рентгенологические исследования). При оценке результатов исследований важно следить за динамикой уровня антител. ИФА требует микроколичеств биологической жидкости (намного меньше, чем для проведения микроскопии), также он высоко чувствителен, хорошо воспроизводим, поддается автоматизированному учету, не требует проведения биопсии в случае ТБ внелегочной локализации [7, 45].

Одними из наиболее перспективных антигенов МБТ для серологической диагностики, по мнению А. Вербона (Академический медицинский центр, Амстердам, Нидерланды), являются секреторные антигены с молекулярной массой 24 и 38 kDa, а также протеины теплового шока с молекулярной массой 12 kDa и 16 kDa. В настоящее время их с успехом испытывают для диагностики латентной формы ТБ в случаях, когда кожный тест, бактериоскопия патологического материала, а также тестирование в ПЦР дают отрицательные результаты. Выявление у обследуемых специфических антител позволяет начать лечение задолго до того, как будет поставлен окончательный диагноз на основании изоляции туберкулезных микобактерий [66].

Вместе с тем следует подчеркнуть, что определение антител к возбудителю ТБ в сыворотке крови позволяет сформировать лишь должную медицинскую настороженность клинициста в отношении туберкулезной ин-

фекции, оценки напряженности поствакцинального иммунитета, но не может использоваться в качестве единственного обоснования для подтверждения диагноза [45].

Иммуноферментный анализ является относительно простым, недорогим, не требующим сложного лабораторного оборудования, и прежде всего этот метод подходит для широкого использования в странах с низкими доходами [68, 69]. Роль антитело-опосредованного иммунитета в защите от микобактерий ТБ остается неопределенной. Микобактерии ТБ вызывают выработку антител к ряду антигенов, которые могут быть использованы в качестве маркеров инфекции ТБ [67, 69, 70]. Первое поколение серодиагностических тестов имело низкую специфичность, поскольку используемые антигены являлись общими для всех микобактерий, а также других бактериальных родов, таких как *Nocardia* и *Corynebacterium* [67]. Эта проблема с низкой специфичностью была решена при использовании очищенных мономерных и рекомбинантных антигенов, специфичных для ТБ [67]. Антительный ответ на туберкулезные микобактерии при различных формах инфекции, а также у разных групп пациентов варьирует в широких пределах. Это диктует необходимость применения для серологической диагностики маркерных антигенов МБТ. С этой целью были получены и испытаны 3 рекомбинантных антигена МБТ (аналог протеина с молекулярной массой 38kDa, Ag16 и Ag85B). При исследовании сывороток крови больных туберкулезом, клинически здоровых, но инфицированных микобактериями ТБ, страдающих другими инфекционными и неинфекционными болезнями, а также здоровых людей в иммуноферментном тесте установлено, что чувствительность и специфичность его проведения с отдельными из упомянутых выше антигенов варьирует в пределах 25–42% и 93–96% соответственно. Использование комплекса этих антигенов способствовало повышению чувствительности иммуноферментного теста до 76% [71].

В целом анализы, основанные на иммунологических ответах к МБТ, предпочтительнее современных методов бактериологической диагностики ТБ, потому что они не зависят от выявления микобактерий. В последние годы определение антител в клинических образцах становится все более интересным [7].

При разработке серологических методов диагностики ТБ проводилась оценка различных микобактериальных антигенов: секреторные антигены культуральной жидкости [72], очищенные экстракты гликолипидов и полисахаридов [73], микобактериальные компоненты, полученные в результате обработки клеток ультразвуком [74], антигены, полученные путем иммуноаффинной хроматографии [75], PPD [76], или наиболее хорошо изученные микобактериальные антигены, такие как антиген-5 (38-kDa антиген, Rv0934), антиген-60 (A60), P32-антиген (Rv3804c), 30-kDa антиген (Ag85B, MPT59, v1886c), корд-фактор, 88-kDa антиген (MTB81,

Rv1837c), 27-kDa антиген (MPT51, Rv3803c), Kp90 и LAM [67, 69, 77]. Белки культурального фильтрата активно изучаются, а поверхностные белки, такие как липопротеины, к примеру, 38-kDa антиген, или PE/PPE белки, являются перспективными для серодиагностических тестов. Несколько десятков различных белков были выделены из культивируемой жидкости *M. tuberculosis* [78–82].

В основном, все антигены *M. tuberculosis* имеют различный серодиагностический потенциал и могут быть разделены на шесть категорий в зависимости от типа ТБ, для которого они в первую очередь являются диагностически значимыми. Важно отметить, что антигены МБТ не являются взаимно исключаящими. Данные группы сформированы предположительно и должны быть изучены более детально [7].

1. Антигены, которые могут быть использованы для обнаружения латентно-инфицированных пациентов или в случае выявления бытовых контактов: 16-kDa ( $\alpha$ -кристаллин), 14-kDa и 6-kDa антигены.
2. Антигены, которые могут быть использованы для обнаружения больных ТБ на ранней стадии заболевания: MTB81, MPT51, MPT32 и Ag85C.
3. Антигены, которые могут быть использованы для обнаружения больных ТБ с сопутствующей инфекцией ВИЧ: TB9.7, TB15.3, TB16.3, TB51, MTB81, MPT32 и Ag85B.
4. Антигены, которые могут быть использованы для обнаружения антител в сыворотке крови больных с внелегочным ТБ: DAT, TAT, SL-I, корд-фактор, GST-822, ESAT-6, MTB11 (CFP-10), TB9.7, TB15.3, TB16.3, TB51 и 38-kDa антиген, IgA антитела к MPT64 изучались в плевральном выпоте [83], MPT64 также легко обнаружить в тканях больных туберкулезом с использованием иммуногистохимии [84].
5. Антигены, которые могут быть использованы для обнаружения больных с активным ТБ легких (ESAT-6, MTB11 (10-kDa), 19-kDa, 14-kDa, 16-kDa, MPT64a, MTB48, MTB48, MTB81 (88-kDa), MPT51 (27-kDa), A-60, TB9.7 (10-kDa), TB15.3 (15-kDa), TB16.3 (16-kDa), TB51 (51-kDa).
6. Сочетания рекомбинантных белков и растворимых белков, которые могут обнаруживать различные формы ТБ (вызванные различными штаммами в различных популяциях): 38-kDa антигена, MTB8, MTB11, MTB48, MTB81, DPER, TB9.7 и TB16.3.

Таким образом, к настоящему времени нет доступных серодиагностических тестов для определения ТБ с достаточной чувствительностью и специфичностью. Развитие серодиагностических тестов должно учитывать индивидуальные особенности антительного ответа, дифференциальную экспрессию генов и последующий синтез белков микобактерий ТБ, в зависимости от штамма и стадии заболевания.

Результаты проводимых исследований показывают, что комбинации антигенов могут дать более желаемый

уровень чувствительности, не затрагивая специфику, нежели использование каждого антигена в отдельности. Антиген молекулярной массой 38-kDa является наиболее изученным кандидатом для разрабатываемых серодиагностических тестов. Тем не менее, этот антиген связан в основном с активной формой заболевания. Также отмечается очень низкая чувствительность этого антигена в случае сочетанной ВИЧ/ТБ-инфекции, внелегочного ТБ и ТБ у детей. Антиген с молекулярной массой 38-kDa должен быть дополнен другими антигенами, чтобы увеличить чувствительность, так как антигенные композиции различных штаммов различны и зависят от стадии заболевания и генетических факторов самого пациента.

Возможными вариантами серологических методов исследования в России являются тест-системы «АТ-ТУБ-Бест-стрип» ЗАО «Вектор-Бест» и тест-система для определения антител к возбудителю туберкулеза ООО «Аквапаст», которые применяются в постановке реакции иммуноферментного анализа. Тест-система «АТ-ТУБ-Бест-стрип» сконструирована так, чтобы выявлять в сыворотке или плазме крови человека специфические антитела всех трех классов иммуноглобулинов: G, M и A. При необходимости процедура анализа может быть адаптирована и для работы с другими биологическими жидкостями: мочой, мокротой, бронхо-альвеолярным лаважем, слюной и т. д. Широкое использование ИФА-метода лабораториями, простота его постановки и возможность получения результатов исследования большого количества проб за 2–3 часа позволяют успешно использовать данный метод серодиагностики для скрининга ТБ, выявления групп риска и оценки эпидемиологической обстановки [45].

#### Литература

1. Global tuberculosis control: WHO report 2011 // [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2011/gtbr11\\_main.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_main.pdf)
2. *Launois P., Drowart A., Bourreau E. et al.* T-cell reactivity against mycolyl transferase antigen 85 of *M. tuberculosis* in HIV-TB coinfecting subjects and in AIDS patients suffering from tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections // *Clinical and Developmental Immunology*. 2011; 2011: 2–10.
3. *Reddy K.P., Brady M.F., Gilman R.H. et al.* MODS for tuberculosis screening prior to isoniazid preventive therapy in HIV-infected persons // *Clin. Infect. Dis.* 2010; 50: 988–996.
4. *Page K.R., Chaisson R., Godfrey-Faussett P.* Tuberculosis-HIV Coinfection: Epidemiology, Clinical Aspects, and Interventions // *Reichman and Hershfield's Tuberculosis. Third Edition, Part A* / ed. by M. Raviglione. Informa healthcare, New York, 2006: 371–416.
5. *Hanrahan C.F., Golub J.N.E., Mohapi L. et al.* Body mass index and risk of tuberculosis and death // *AIDS*. 2011; 24 (10): 1501–1508.
6. *Wood R., Middlekoop K., Myer L. et al.* Undiagnosed tuberculosis in a community with high HIV prevalence. Implications for Tuberculosis control // *Amer. G. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 175: 87–93.
7. *Abebe F., Holm-Hansen C., Wiker H.G., Bjune G.* Progress in Serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection // *Scand. J. of Immunology*. 2007; 66: 176–191.
8. *Perkins M.D., Cunningham J.* Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era // *JID*. 2007: 15–23.
9. *El-Sadr W.M., Tsiouris S.J.* HIV-associated tuberculosis: diagnostic and treatment challenges // *Semin. Respir. Crit. Care. Med.* 2008; 29: 525–531.
10. *Shafer R.W., Edlin B.R.* Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade // *Clin. Infect. Dis.* 1996; 22 (4): 683–704.
11. *Raviglione M.C., Narain J.P., Kochi A.* Ассоциированный с ВИЧ-инфекцией туберкулез в развивающихся странах: клинические особенности, диагностика и лечение // *Бюллетень ВОЗ*. 1992; 4: 515–526.
12. *Kim T.C., Blackman R.S., Heatwole K.M. et al.* Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pre-treatment and positive smears post-treatment // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984; 129: 264–268.
13. *Murray C.J.* World tuberculosis burden // *Lancet*. 1990; 335: 1043–1044.
14. *Anthony R.M., Kolk A.H., Kuijper S., Klatser P.R.* Light emitting diodes for auramine O fluorescence microscopic screening of *Mycobacterium tuberculosis* // *Int. J. Tuberc. Dis.* 2006; 10: 1060–1062.
15. *Steingarta K.R., Henry M., Ng V. et al.* Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review // *Lancet. Infect. Dis.* 2006; 6: 570–581.
16. *Ramsay A., Squire S.B., Siddiqi K. et al.* The bleach microscopy method and case detection for tuberculosis control // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2006; 10: 256–258.
17. *Smithwick R.W., Stratigos C.B.* Acid-fast microscopy on polycarbonate membrane filter sputum sediments // *J. Clin. Microbiol.* 1981; 13: 1109–1113.
18. *Steingart K.R., Ng V., Henry M. et al.* Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review // *Lancet. Infect. Dis.* 2006; 6: 664–674.
19. *Bouza E., Diaz-Lopez M.D., Moreno S. et al.* *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia in patients with and without human immunodeficiency virus infection // *Arch. Intern. Med.* 1993; 153 (4): 496–500.
20. *Schwoebel V., Delmas M.C., Ansell-Parc R.A., Brunei J.B.* Factors associated with extrapulmonary tuberculosis as an AIDS-defining disease in Europe // *Tubercle*. 1995; 76 (4): 281–285.
21. *Shafer R.W., Coldberg R., Sierra M. et al.* Frequency of *M. tuberculosis* bacteremia in patients with tuberculosis in an area endemic for AIDS // *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1989; 140 (6): 1611–1613.
22. *Shafer R.W., Jones W.D.* Relapse of tuberculosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome despite 12 months of antituberculous therapy and continuation of isoniazid // *Tubercle*. 1991; 72 (2): 149–151.
23. *Barnes P.F., Bloch A.B., Davidson P.T., Snider D.E. Jr.* Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection // *N. Engl. J. Med.* 1991; 324: 1644–1650.
24. *Pithie A.D., Chicksen B.* Fine-needle extrathoracic lymphnode aspiration in HIV-associated sputum-negative tuberculosis // *Lancet*. 1992; 340 (8834–8835): 1504–1505.
25. *Bouza E., Diaz-Lopez M.D., Moreno S. et al.* *Mycobacterium tuberculosis* bacteremia in patients with and without human immunodeficiency virus infection // *Arch. Intern. Med.* 1993; 153 (4): 496–500.
26. *Champ M.E., Hickey M.M., Gazzara M.M.* Reemergence of tuberculosis: Letter // *Brit. Med. J.* 1993; 306 (6882): 932–932.
27. *Baylan O., Kisa O., Albay A., Doganci L.* Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratory diagnosis of tuberculosis and determination of anti-tuber-

- culosis drug susceptibility // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2004; 8: 772–777.
28. Lee J.J., Suo J., Lin C.B. et al. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2003; 7: 569–574.
29. Butt T., Ahmad R.N., Kazmi S.Y., Mahmood A. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by mycobacteriophage assay // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2004; 8: 899–902.
30. Alcaide F., Gali N., Dominguez J. et al. Usefulness of a new mycobacteriophage-based technique for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis // *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 2867–2871.
31. Albert H., Heydenrych A., Brookes R. et al. Performance of a rapid phage-based test, FASTPlaqueTB, to diagnose pulmonary tuberculosis from sputum specimens in South Africa // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2002; 6: 529–537.
32. Albay A., Kisa O., Baylan O., Doganci L. The evaluation of FASTPlaqueTB test for the rapid diagnosis of tuberculosis // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 46: 211–215.
33. Левтонова Е.В., Сокольская Н.С., Калечиц О.М., Экно Р.Я. Чувствительность к туберкулину взрослого населения при различных изменениях в легких // Тез. докл. Украинского республиканского совещания по итогам борьбы с туберкулезом в УССР в 1977 году. Чернигов, 1978: 45–46.
34. Митинская Л.А. Туберкулинодиагностика // Туберкулез органов дыхания. М.: Медицина, 1988: 100–110.
35. Rodrigues C. BCG revaccination against tuberculosis // *Lancet.* 1996; 9027: 611–621.
36. Menzies R. Tuberculin skin testing // *Tuberculosis a comprehensive international approach.* Reichman L., Hershfield E., ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 2000: 279–322.
37. Кисилев В.И., Барановский П.М., Пупышев С.А. и др. Новый кожный тест для диагностики туберкулеза на основе рекомбинантного белка ESAT-CFP // *Молекуляр. Мед.* 2008; 4: 4–6.
38. Литвинов В.И., Слогоцкая Л.В., Сельцовский И.П. и др. Новый кожный тест для диагностики туберкулеза // *Рос. мед. журнал.* 2009; 1: 52–56.
39. Аксенова В.А. Выявление туберкулеза и тактика диспансерного наблюдения за лицами из групп риска с использованием рекомбинантного туберкулезного аллергена – «Диаскинтест» // *Туберкулез и болезни легких.* 2010; 2: 13–19.
40. Piersimoni C., Scarparo C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples // *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 5355–5365.
41. Huggett J.F., McHugh T.D., Zumla A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2003; 35: 1407–1412.
42. Smith K.C., Starke J.R., Eisenach K. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction // *Pediatrics.* 1996; 97: 155–160.
43. Neu N., Saiman L., San Gabriel P. et al. Diagnosis of pediatric tuberculosis in the modern era // *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1999; 18: 122–126.
44. Литвинов В.И., Гильбурд Б.Ш., Черноусова Л.Н., Романова Р.Ю. Антигены микобактерий туберкулеза // *Проблемы туберкулеза.* 1989; 10: 68–72.
45. Гладкова С.Е., Решетников С.С., Пряхина В.Н. Опыт применения тест-системы «АТ-Туб-Бест» для диагностики туберкулеза // *Медицина и здоровье.* 2011; 5 (61): 22–25.
46. Гильбурд Б.Ш., Марков А.Н., Фондаминская Л.Д., Авдиенко В.Г. Противотуберкулезные антитела к антигенам разной молекулярной массы у больных с активным туберкулезом легких // *Проблемы туберкулеза.* 1989; 11: 40–43.
47. Weldingh K., Rosenkrands I., Okkels L.M. et al. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens // *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 57–65.
48. Hendrickson R.C., Douglass J.F., Reynolds L.D. et al. Mass spectrometric identification of mtb81, a novel serological marker for tuberculosis // *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 2354–2361.
49. Samanich K.M., Keen M.A., Vissa V.D. et al. Serodiagnostic potential of culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7: 662–668.
50. Houghton R.L., Lodes M.J., Dillon D.C. et al. Use of multi-epitope polypeptides in serodiagnosis of active tuberculosis // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002; 9: 883–891.
51. McDonough J.A., Sada D.E., Sipolla A.A. et al. Microplate and dot immune assay for the serodiagnosis of tuberculosis // *J. Lab. Clin. Med.* 1992; 120: 318–322.
52. Daniel T.M. et al. Reduced sensitivity of tuberculosis serodiagnosis in patients with AIDS in Uganda // *Tuberc. Lung. Dis.* 1994; 75: 33–37.
53. Uma Devi K.R., Ramalingam B., Raja A. Antibody response to *Mycobacterium tuberculosis* 30 and 16 kDa antigens in pulmonary tuberculosis with human immunodeficiency virus coinfection // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 46: 205–209.
54. Harboe M., Oettinger T., Wiker H.G. et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG // *Infect. Immun.* 1996; 64: 16–22.
55. Colanelli R., Spencer J.S., Bifani P. et al. MTA-10, the product of the Rv3874 gene of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits tuberculosis-specific, delayed-type hypersensitivity in guinea pigs // *Infect. Immun.* 2000; 68: 990–993.
56. Barnes P.F. Diagnosing latent tuberculosis infection: turning glitter to gold // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2004; 170: 5–6.
57. Mori T., Sakatani M., Yamagishi F. et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2004; 170: 59–64.
58. Ravn P., Munk M.E., Andersen A.B. et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12: 491–496.
59. Lalvani A., Pathan A.A., Durkan H. et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells // *Lancet.* 2001; 357: 2017–2021.
60. Hill P.C., Fox A., Jeffries D.J. et al. Quantitative T cell assay reflects infectious load of *Mycobacterium tuberculosis* in an endemic case contact model // *Clin. Infect. Dis.* 2005; 40: 273–278.
61. Lalvani A., Millington K.A. T-cell-based diagnosis of childhood tuberculosis infection // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2007; 20: 64–71.
62. Brock I., Munk M.E., Kok-Jensen A., Andersen P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10 // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2001; 5: 462–467.
63. Ewer K., Deeks J., Alvarez L. et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak // *Lancet.* 2003; 361: 1168–1173.
64. Стаханов В.А., Васильев Н.А., Леви Д.Т., Рухамина М.Л. Противотуберкулезные антитела у больных туберкулезом легких в процессе химиотерапии // *Проблемы туберкулеза.* 2001; 5: 48–50.
65. Хаертынова И.М., Валиев Р.Ш., Цибулькин А.П. и др. Клинико-иммунологические особенности ВИЧ-инфекции, сочетанной с

- туберкулезом // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2009; 6: 41–46.
66. Verbon A. Development of a serological test for tuberculosis. Problems and potential // Trop. Geogr. Med. 1994; 46 (5): 275–279.
67. Daniel T.M., Debanne S.M. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay // Am. Rev. Respir. Dis. 1987; 135: 1137–1151.
68. Rasolofo V., Chanteau S. Field evaluation of rapid tests for tuberculosis diagnosis // J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 4201.
69. Chan E.D., Heifets L., Iseman M.D. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review // Tuber. Lung. Dis. 2000; 80: 131–140.
70. Andersen P., Munk M.E., Pollock J.M., Doherty T.M. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis // Lancet. 2000; 356: 1099–1104.
71. Imaz M.S., Schmelling M.F., Kaempfer S. et al. Serodiagnosis of tuberculosis: specific detection of free and complex-dissociated antibodies anti-mycobacterium tuberculosis recombinant antigens // Braz. J. Infect. Dis. 2008; 12: 3.
72. Laal S., Samanich K.M., Sonnenberg M.G. et al. Surrogate marker of preclinical tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: antibodies to an 88-kDa secreted antigen of Mycobacterium tuberculosis // J. Infect. Dis. 1997; 176: 133–143.
73. Escamilla L., Mancilla R., Glender W., Lopez-Marin L.M. Mycobacterium fortuitum glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 1996; 154: 1864–1867.
74. Rosen E.U. The diagnostic value of an enzyme-linked immune sorbent assay using adsorbed mycobacterial sonicates in children // Tubercle. 1990; 71: 127–130.
75. Daniel T.M., De Murillo G.L., Sawyer J.A. et al. Field evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of tuberculosis // Am. Rev. Respir. Dis. 1986; 134: 662–665.
76. Barrera L., Miceli I., Ritacco V. et al. Detection of circulating antibodies to purified protein derivative by enzyme-linked immunosorbent assay: its potential for the rapid diagnosis of tuberculosis // Pediatr. Infect. Dis J. 1989; 8: 763–767.
77. Garg S.K., Tiwari R.P., Tiwari D. et al. Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations, and possibilities // J. Clin. Lab. Anal. 2003; 17: 155–163.
78. Wiker H.G., Harboe M., Bennedsen J., Closs O. The antigens of Mycobacterium tuberculosis, H37Rv, studied by crossed immunoelectrophoresis – comparison with a reference system for Mycobacterium bovis, BCG // Scand. J. Immunol. 1988; 27: 223–239.
79. Sonnenberg M.G., Belisle J.T. Definition of Mycobacterium tuberculosis culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry // Infect. Immun. 1997; 65: 4515–4524.
80. Rosenkrands I., Weldingh K., Jacobsen S. et al. Mapping and identification of Mycobacterium tuberculosis proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection // Electrophoresis. 2000; 21: 935–948.
81. Mattow J., Schaible U.E., Schmidt F. et al. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent Mycobacterium tuberculosis H37Rv and attenuated M. bovis BCG Copenhagen // Electrophoresis. 2003; 24: 3405–3420.
82. Mälen H., Berven F.S., Fladmark K.E., Wiker H.G. Comprehensive analysis of exported proteins from Mycobacterium tuberculosis H37Rv // Proteomics. 2007; 7: 1702–1718.
83. Kaisermann M.C., Sardella I.G., Trajman A. et al. IgA antibody responses to Mycobacterium tuberculosis recombinant MPT-64 and MT-10.3 (Rv3019c) antigens in pleural fluid of patients with tuberculous pleurisy // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2005; 9: 461–466.
84. Mustafa T., Wiker H.G., Mfinanga S.G. et al. Immunohistochemistry using a Mycobacterium tuberculosis complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis // Mod. Pathol. 2006; 19: 1606–1614.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ ДИССЕМИНИРОВАННОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ПРИ БЛАГОПРИЯТНОМ И НЕБЛАГОПРИЯТНОМ ТЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Е.Ю. ЗОРИНА<sup>1</sup>, Р.В. ОРЛОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургское государственное учреждение здравоохранения «Городской клинический онкологический диспансер»

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова

**Резюме.** Прогнозирование течения опухолевого процесса у больных диссеминированным КРР на основе определения предиктивных маркеров (TS, TP, DPD, Ercc-1, COX-2, микросателлитная нестабильность, KRAS) позволит рационально планировать противоопухолевую лекарственную терапию в комплексном лечении пациентов.

**Ключевые слова:** диссеминированный колоректальный рак, химиотерапия, молекулярно-генетический анализ, предиктивные противоопухолевые маркеры.

## MOLECULAR-GENETIC DIFFERENCES IN TUMOR TISSUE IN PATIENTS WITH A DIAGNOSIS OF DISSEMINATED COLORECTAL CANCER IN FAVORABLE AND UNFAVORABLE COURSE OF THE DISEASE

E.Y. ZORINA<sup>1</sup>, R.V. ORLOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Government-owned Health Institution "State City Oncologic Dispensary"

<sup>2</sup> First Pavlov State Medical of Saint-Petersburg

**Summary.** Forecasting the course of the tumor process in patients with disseminated RAF on the basis of the definition of predictive markers (DPD, TS, TP, COX-2, Ercc-1, MSI, KRAS) will allow to plan rationally for anticancer drug therapy in the complex treatment of patients

**Key words:** advanced colorectal cancer, chemotherapeutical treatment, predictive markers, molecular-genetic method.

### Данные для корреспонденции

Зорина Е.Ю.: 198255, Санкт-Петербург, проспект Ветеранов, 56, тел.: +7-921-189-13-74

### Введение

На сегодняшний день в практике онкологов для планирования противоопухолевого лечения принято оценивать опухолевый процесс по системе TNM. В течении десятилетий используются только фенотипические признаки стадии заболевания [3, 23]: размер первичной опухоли, поражение региональных лимфатических узлов, наличие или отсутствие отдаленных метастазов, степень дифференцировки опухоли. На практике известно, что процесс течения опухолевого заболевания и ответа на противоопухолевую лекарственную терапию у «фенотипически одинаковых пациентов» может иметь значительные различия [12]. В последнее время стремительное развитие знаний о канцерогенезе на молекулярном уровне [5, 7] позволяет планировать противоопухолевое лечение на основе предиктивных маркеров противоопухолевой терапии, прогнозировать течение опухолевого заболевания, опираясь на знание молекулярно-генетических характеристик опухолевой ткани [1, 3, 4, 6, 21].

### Цель работы

При назначении противоопухолевой лекарственной терапии учитывать молекулярно-генетические характеристики опухолевой ткани. Сопоставить полученные

данные с ответом на проводимое лечение и течение опухолевого заболевания.

### Материалы и методы

В работе в период с 2007 по 2010 г. проспективно исследованы молекулярно-генетические характеристики опухолевой ткани у 93 пациентов с диагнозом диссеминированный колоректальный рак. Проведена оценка сочетаний предиктивных маркеров противоопухолевой терапии с объективным ответом на цитостатическое лечение и течением опухолевого процесса.

### Результаты исследования

В работе была составлена панель молекулярно-генетических маркеров, изучающая экспрессию дигидропиримидиндегидрогеназы (DPD), тимидилатсинтетазы (TS), тимидинфосфорилазы (TP), Ercc-1, COX-2, мутацию в гене k-RAS, наличие микросателлитной нестабильности (MSI).

Как показали результаты собственных исследований в нашей работе, молекулярно-генетические характеристики опухолевого процесса рака ободочной и прямой кишки широко варьируемы. Гетерогенность колорек-

тального рака определяет существенную роль в течении опухолевого заболевания и ответ опухоли на цитостатическую терапию.

При анализе молекулярно-генетического профиля опухоли отмечено, что наименьшая выживаемость пациентов (100% пациентов прожили менее 6 месяцев) зарегистрирована при сочетании высокой экспрессии 6 молекулярных факторов: TS (+), TP (+), DPD (+), COX-2 (+), Eгсс-1 (+), k-RAS (+). Данный вариант сочетания молекулярных маркеров отмечен нами как крайне неблагоприятный для прогноза заболевания. Вне зависимости от проводимого лекарственного лечения, прогрессирование заболевания на фоне первой линии ПХТ зарегистрировано у 100% пациентов. Пациенты с таким молекулярно-генетическим профилем составили 7,5% от общего числа.

Наибольшая выживаемость пациентов, более 36 месяцев прожили 83,4% больных, зарегистрирована при сочетании низкой экспрессии 6 молекулярных факторов: TS (-), TP (-), DPD (-), COX-2 (-), Eгсс-1 (-), k-RAS (-). Данный вариант сочетания молекулярных маркеров отмечен нами как крайне благоприятный для прогноза заболевания и лекарственного лечения, объективный ответ на фоне первой линии ПХТ зарегистрирован у 75% пациентов. Пациенты с таким молекулярно-генетическим профилем составили 13,9% от общего числа.

Регистрация K-RAS мутации у пациентов с благоприятным сочетанием молекулярных маркеров TS (-), TP (-), DPD (-), COX-2 (-), Eгсс-1 (-) нивелирует их благоприятное влияние на прогноз: 3-годичная выживаемость у таких пациентов не достигнута, 2-годичная зарегистрирована в 20% случаев, что сравнимо с выживаемостью в общей популяции пациентов. Выявлено, что наличие микросателлитной нестабильности в опухолевой ткани, которая встречается с частотой 5,4%, вне зависимости от K-RAS статуса опухоли и сочетания других молекулярных показателей, является единственным независимым фактором для крайне благоприятного прогноза: 3-годичная выживаемость зарегистрирована у 80% пациентов.

При сочетании других молекулярно-генетических вариантов опухолевой ткани у остальных пациентов четких закономерностей течения опухолевого процесса выявлено не было. Общая выживаемость составляла от 6 до 24 месяцев, требовала оценки не только молекулярных маркеров, но степени распространения опухолевого процесса, общего состояния пациентов, назначения многокомпонентных схем лекарственной противоопухолевой терапии.

## Выводы

Определение молекулярно-генетических характеристик опухолевой ткани у пациентов с диагнозом диссеминированный колоректальный рак значительно расширяет возможности рационального планирования

комплексного лечения. В группе пациентов с благоприятным прогнозом целесообразно проводить предоперационную химиотерапию с прогнозируемым положительным ответом на цитостатическое лечение, также в этой группе пациентов целесообразно проведение циторедуктивного оперативного лечения.

В группе пациентов с неблагоприятным прогнозом мы считаем нецелесообразным проводить предоперационную химиотерапию перед удалением первичной опухоли. Оперативное лечение должно быть выполнено в первую очередь и преследовать цель уменьшения опухолевой массы и устранения угрозы развития острых осложнений колоректального рака, таких как острая кишечная непроходимость, кровотечение из опухоли, перфорация опухоли. Выполнение комбинированного оперативного лечения с удалением отдаленных метастазов неэффективно, а операционная травма и риск развития послеоперационных осложнений возрастают.

Проведение химиотерапии у пациентов с таким молекулярно-генетическим профилем неэффективно, следовательно, проводить лечение многокомпонентными и токсичными схемами цитостатиков нецелесообразно. Однако мы не вправе отказать в лекарственном противоопухолевом лечении таким пациентам только на основании полученных данных в нашей работе.

## Литература

1. Базин С.И., Гарин А.М. Рак толстой кишки, состояние проблемы // Онкология и гематология. 2003.
2. Гарин А.М. Антиметаболиты. М., 1998.
3. Гарин А.М., Базин С.И. Десять наиболее распространенных злокачественных опухолей. Москва, 2006.
4. Гарин А.М., Базин С.И. Справочное руководство по лекарственной терапии солидных опухолей. Москва, 2007.
5. Имянитов Е.Н., Калиновский В.П., Князев П.Г. и др. Молекулярная генетика опухолей человека // Вопросы онкологии. 1997; 1: 95–101.
6. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярные аспекты патогенеза первично-множественных опухолей // Российский онкологический журнал. 1998; 5: 47–51.
7. Копнин Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения // Практическая онкология. 3 (4): 229–235.
8. Мартынюк В.В. Рак толстой кишки (заболеваемость, смертность, факторы риска, скрининг) // Практическая онкология: Избранные лекции / под ред. С.А. Тюляндина, В.М. Моисеенко. СПб.: Центр ТОММ, 2004: 151–161.
9. Моисеенко В.М., Орлова Р.В. Принципы лекарственного лечения больных диссеминированным раком молочной железы // Практическая онкология. 2000; 2: 19–21.
10. Степанова Е.В., Абсаямова О.В., Личиницер М.Р. Значение уровня тимидилат-синтазы для прогноза и эффекта химиотерапии при колоректальном раке // Современная онкология. 2004; 6 (4): 12–14.
11. Тюляндин С.А. Противоопухолевая активность УФТ. М., 1998.
12. Филимоненко В.П. Поиск путей индивидуализации лекарственного лечения больных колоректальным раком препаратами фторпиримидинового ряда. СПб., 2007.

13. Bertino J., Banerjee D. Is the measurement of thymidylate synthase to determine suitability for treatment with 5-fluoropyrimidines ready for prime time? // Clin. Cancer Res. 2003; 9: 1235–9.
14. Buroker T.R., O'Connell M.J., Wieand H.S. et al. Randomized comparison of two schedules of fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced colorectal cancer // J. Clin. Oncol. 1994; 12: 14–20.
15. Carter S.K. Large Bowel cancer. The current status of treatment // J. Nat. Canc. Inst. 1976; 56: 3–10.
16. Colorectal Cancer ( PDQ®): Treatment Last Modified 05/16/2008.
17. O'Connor S.L., Cho J.H., McDonnell T.J. The application of molecular techniques to solid tumor // Semin. Diagn. Pathol. 2002: 94–103.
18. de Jong M.M., Nolt I.M., te Meerman G.J. et al. Low-penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2002; 11: 1332–1352.
19. Delap R.J. Antimetabolite agents // Current cancer therapeutics.
20. Diasio R.B. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase on 5-FU pharmacology // Oncology (Huntingt). 2001; 15 (Suppl. 2): 21–6; discussion 27.
21. Dibirov R.K., Kutukova S.I., Yaremenko A.I., Manikhas G.M. The prognostic importance of molecular-genetics and morphological factors in prognosis of recurrent HNSCC // Radiotherapy and Oncology. 2013; 106: 42.
22. El-Naggar A.K. Methods in molecular surgical pathology // Semin. Diagn. Pathol. 2002: 56–71.
23. Faivre J., Bouvier A.M. Epidemiology and screening of colorectal cancer // Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 2002; 16: 187–199.

УДК [616.345+616.351]-006.6-08.28:575.17

## ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМОВ ХИМИОТЕРАПИИ ДИССЕМИНИРОВАННОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА КОМБИНАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРЕДИКТИВНЫХ МАРКЕРОВ.

Е.Ю. ЗОРИНА<sup>1</sup>, Р.В. ОРЛОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургское государственное учреждение здравоохранения «Городской клинический онкологический диспансер»

<sup>2</sup> Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова

**Резюме.** Выбор схемы химиотерапии для пациентов с диагнозом диссеминированного колоректального рака на основе предиктивных маркеров противоопухолевой терапии (TS, TP, DPD, Ercc-1, COX-2, MSI, KRAS) позволит рационально планировать противоопухолевую лекарственную терапию в комплексном лечении пациентов.

**Ключевые слова:** диссеминированный колоректальный рак, химиотерапия, молекулярно-генетический анализ, предиктивные противоопухолевые маркеры.

## OPTIMIZATION OF REGIMES OF CHEMOTHERAPY DISSEMINATED COLORECTAL CANCER ON THE BASIS OF THE ANALYSIS OF THE COMBINATION OF MOLECULAR PREDICTIVE MARKERS

E.Y. ZORINA<sup>1</sup>, R.V. ORLOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Government-owned Health Institution "State City Oncologic Dispensary"

<sup>2</sup> First Pavlov State Medical of Saint-Petersburg

**Summary.** The choice of chemotherapy for patients with a diagnosis of disseminated colorectal cancer on the basis of predictive markers of anticancer therapy (TS, TP, DPD, Ercc-1, COX-2, MSI, KRAS) will allow to plan rationally for anticancer drug therapy in the complex treatment of patients.

**Key words:** advanced colorectal cancer, chemotherapeutical treatment, predictive markers, molecular-genetic method.

### Данные для корреспонденции

Зорина Е.Ю.: 198255, Санкт-Петербург, проспект Ветеранов, 56, тел.: +7-921-189-13-74

### Введение

В России колоректальный (КРР) рак занимает третье место в структуре смертности от всех злокачественных образований. На момент выявления заболевания около 30% пациентов имеют диссеминированную стадию процесса и нуждаются в проведении системной противоопухолевой лекарственной терапии [3, 8]. Часть пациентов, которым было выполнено радикальное ле-

чение по поводу локализованных форм заболевания, будет нуждаться в проведении химиотерапевтического лечения в связи с прогрессированием заболевания [4, 16]. Начиная с 1990-х годов, в арсенале химиотерапевтов появляются новые группы препаратов для лечения диссеминированного КРР (дКРР), которые повышают эффективность проводимого лечения. Введение в схемы

современных противоопухолевых препаратов: иринотекана, оксалиплатина, кселоды, УФТ, таргетных препаратов, увеличило медиану выживаемости с 10 месяцев до 20–24 месяцев [11, 12]. Препараты нового поколения для лечения дКРР отличаются от традиционного 5-фторурацила другими механизмами блокирования опухолевой трансдукции, следовательно, появились возможности для применения многокомпонентных схем химиотерапии. Изучение канцерогенеза и его ферментативных каскадов дало возможность онкологу-клиницисту понимать молекулярные механизмы блокирования цитостатическим препаратом деления опухолевой клетки и на основании знаний молекулярно-генетических предиктивных маркеров индивидуализировать лекарственную терапию [10, 14, 17].

В настоящее время в повседневной практике онколога продолжает использоваться как классическая схема цитостатической терапии с применением длительных инфузий 5-ФУ в комбинации с модулятором биохимического действия лейковорином (ЛВ), так и современные трех- и более компонентные схемы лекарственного лечения [2, 10, 13]. В большинстве случаев, около 60%, при использовании трехкомпонентных схем химиотерапии регистрируется объективный ответ. Однако и при применении двухкомпонентных схем (5-ФУ с ЛВ) у 20% пациентов также будет зафиксирован положительный ответ [15].

**Цель работы**

На основании молекулярно-генетических маркеров противоопухолевой терапии разработать алгоритм для

выбора двух- или трехкомпонентных схем лекарственной терапии для лечения пациентов с диагнозом диссеминированного колоректального рака.

**Материалы и методы**

В режиме проспективного исследования проведен молекулярно-генетический анализ опухолевой ткани 93 пациентам с диагнозом диссеминированного колоректального рака. Все пациенты получали цитостатическую терапию. Выделены пациенты, лечившиеся двух- и трехкомпонентными схемами химиотерапии, проанализирован молекулярно-генетический профиль опухолевой ткани этих больных.

**Результаты собственных исследований**

Пациенты были разделены на 2 группы: в первую вошли больные диссеминированным колоректальным раком с низкой экспрессией всех изучаемых предиктивных маркеров: TC (-), TP (-), DPD (-), COX-2 (-), Erss-1 (-), k-RAS (-), MSI (-). Вторую группу составляли пациенты, у которых в опухолевой ткани в гиперэкспрессии находилось от 1 до 3 предиктивных маркеров. В обеих группах пациенты получали или двухкомпонентную ПХТ по схеме De Gramont или одну из трехкомпонентных схем FOLFOX/FOLFIRI. Сравнивались результаты лечения — частота объективных ответов на цитостатическую терапию.

Результаты представлены в таблице 1.

Объективный ответ в случае назначения режима de Gramont зарегистрирован у 100% пациентов при следующем молекулярно-генетическом профиле опухоли:

**Таблица 1. Сравнительная эффективность двух- и трехкомпонентных схем лекарственного лечения больных с диссеминированным КРР в зависимости от молекулярно-генетических характеристик опухоли**

Молекулярно-генетические характеристики опухоли	TC (-) TP (-) DPD (-) COX-2 (-), Erss-1 (-) k-RAS (-), MSI (-)		Гиперэкспрессия от 1 до 3 молекулярно-генетических маркеров	
	LV +5-FU	LV + 5-FU + иринотекан или оксалиплатин	LV +5-FU	LV + 5-FU + иринотекан или оксалиплатин
<b>Режим ПХТ</b>	LV +5-FU	LV + 5-FU + иринотекан или оксалиплатин	LV +5-FU	LV + 5-FU + иринотекан или оксалиплатин
<b>Количество пациентов</b>	8	4	10	23
<b>Эффективность лечения: ---SD</b>	2 (25%)	1 (25%)	2 (20%)	6 (26%)
<b>Объективный ответ</b>	75%	75%	0%*	65,3%*
---PR	-5 (62,5%)	3 (75%)	0	-14 (61%)
---CR	-1 (12,5%)	0	0	-1 (4,3%)
---PD	0	0	8 (80%)	2 (8,7%)
<b>Циторедуктивные оперативные вмешательства</b>	4 (57.1%)	1 (25%)	0	5 (21,7%)
<b>Лечебный патоморфоз:</b>				
1–2 ст.	0	0	0	3
3–4 ст.	4	1	0	2

Примечание: p < 0,001.

TS (–), TP (–), DPD (–), COX-2 (–), Eгcc-1– k-RAS (–) (данное сочетание встречается у 13% пациентов). Результаты лечения пациентов с аналогичным молекулярно-генетическим портретом опухоли, в схему лечения которых был введен 3-й компонент (оксалиплатин, иринотекан), оказались сопоставимыми с 2-компонентным режимом (de Gramont) — объективный ответ зарегистрирован у 100%. Таким образом, может быть сделан вывод, что 13% пациентов от общей популяции может быть назначен режим de Gramont, как стандарт первой линии ПХТ, без использования в схеме лекарственного лечения оксалиплатина или иринотекана, с той же эффективностью лечения, но с вероятным преимуществом по токсичности и стоимости ПХТ.

Отмечено, что назначение 5-ФУ с лейковорином в рамках режима de Gramont при наличии высокой экспрессии от одного до трех молекулярно-генетических маркеров из рассматриваемых 6 стандартных делает такую схему лечения неэффективной (прогрессирование зарегистрировано у 80% пациентов) и нецелесообразной для назначения. Согласно полученным данным, у пациентов с гиперэкспрессией от 1 до 3 маркеров эффективность лечения достоверно возрастает с введением в схему ПХТ 3-го компонента (оксалиплатин или иринотекан), что приводит к увеличению частоты объективных ответов с 0% до 65,3% ( $p < 0,001$ ).

**Выводы.** Проведение индивидуализированного химиотерапевтического лечения пациентов с диссеминированным колоректальным раком — это необходимость, продиктованная новыми знаниями в молекулярной онкологии, увеличением арсенала противоопухолевых препаратов, расширением подходов к комплексному лечению метастатического колоректального рака, экономическими факторами, что, в конечном итоге, улучшает результаты лечения пациентов с этой патологией.

#### Литература

1. Базин С.И., Гарин А.М. Рак толстой кишки, состояняя проблемы // Онкология и гематология. 2003.
2. Гарин А.М. Антиметаболиты. М., 1998.
3. Гарин А.М., Базин С.И. Десять наиболее распространенных злокачественных опухолей. Москва, 2006.
4. Гарин А.М., Базин С.И. Справочное руководство по лекарственной терапии солидных опухолей. Москва, 2007.
5. Имянитов Е.Н., Калиновский В.П., Князев П.Г. и др. Молекулярная генетика опухолей человека // Вопросы онкологии. 1997; 1: 95–101.
6. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярные аспекты патогенеза первично-множественных опухолей // Российский онкологический журнал. 1998; 5: 47–51.
7. Копнин Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения // Практическая онкология. 3 (4): 229–235.
8. Мартынюк В.В. Рак толстой кишки (заболеваемость, смертность, факторы риска, скрининг) // Практическая онкология: Избранные лекции / под ред. С.А. Тюляндина, В.М. Моисеенко. СПб.: Центр ТОММ, 2004: 151–161.
9. Моисеенко В.М., Орлова Р.В. Принципы лекарственного лечения больных диссеминированным раком молочной железы // Практическая онкология. 2000; 2: 19–21.
10. Степанова Е.В., Абсаямова О.В., Личиницер М.Р. Значение уровня тимидилат-синтетазы для прогноза и эффекта химиотерапии при колоректальном раке // Современная онкология. 2004; 6 (4): 12–14.
11. Тюляндин С.А. Противоопухолевая активность УФТ. М., 1998.
12. Филимоненко В.П. Поиск путей индивидуализации лекарственного лечения больных колоректальным раком препаратами фторпиримидинового ряда. СПб., 2007.
13. Bertino J., Banerjee D. Is the measurement of thymidylate synthase to determine suitability for treatment with 5-fluoropyrimidines ready for prime time? // Clin. Cancer Res. 2003; 9: 1235–9.
14. Buroker T.R., O'Connell M.J., Wieand H.S. et al. Randomized comparison of two schedules of fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced colorectal cancer // J. Clin. Oncol. 1994; 12: 14–20.
15. Carter S.K. Large Bowel cancer. The current status of treatment // J. Nat. Canc. Inst. 1976; 56: 3–10.
16. Colorectal Cancer ( PDQ®): Treatment Last Modified 05/16/2008.
17. Kutukova S.I., Yaremenko A.I., Manikhas G.M., Bozhor S.S. The role of tumor markers and clinic-laboratories result in prognosis of relapse oral squamous cell carcinoma // Radiotherapy and Oncology. 2013; 106: 24–25.
18. O'Connor S.L., Cbo J.H., McDonnell T.J. The application of molecular techniques to solid tumor // Semin. Diagn. Pathol. 2002: 94–103.
19. de Jong M.M., Nolt I.M., te Meerman G.J. et al. Low-penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2002; 11: 1332–1352.

## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДЕСТРУКЦИИ НОГТЕЙ

Е.В. УРАЗОВСКАЯ, З.И. МИКАШИНОВИЧ

ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

кафедра общей и клинической биохимии № 1, Ростов-на-Дону

**Резюме.** В обзоре обсуждаются особенности строения тканей ногтей, основных механизмов нарушения их структуры, молекулярно-биологических реакций апоптоза кератогиалиновых клеток ногтя, роль гипоксии в деструкции ногтей, их клиническое значение и перспективы диагностики ониходистрофии.

**Ключевые слова:** ногти, кератин, деструкция, ониходистрофия, гипоксия.

## MOLECULAR AND BIOLOGICAL BASIS OF THE NAILS DESTRUCTION

E.V. URAZOVSKAYA, Z.I. MIKASHINOVICH

Rostov State Medical University, Department of General and Clinical Biochemistry N 1,

Physician of Clinical Laboratory Diagnostics, Rostov-on-Don

**Summary.** This review discusses the structural features of the nail tissue, the disorders basic mechanisms of their structure, the molecular and biological reactions of the nails keratohyalin cells apoptosis, the hypoxia role in the nails destruction, their clinical significance in the nails pathological processes and the onychodystrophia diagnosis prospects.

**Key words:** nails, keratin, destruction, onychodystrophy, hypoxia.

### Данные для корреспонденции

Уразовская Елена Викторовна, ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, кафедра общей

и клинической биохимии № 1, соискатель кафедры, врач клинической лабораторной диагностики, к. м. н.

Ростов-на-Дону, 344022, пер. Нахичеванский, д. 29.

Эл. почта: e.urazovskaya@rambler.ru

Моб. тел.: 8-928-964-37-06

Деструктивный процесс в ногтях может сопровождать наследственные, системные, легочные, сердечно-сосудистые, обменные и кожные заболевания. Широкая распространенность ониходистрофии среди взрослого населения привлекает серьезное внимание дерматологов и врачей других специальностей. Осложнения, связанные с нарушением роста ногтей в результате изменения проницаемости, прочности и эластичности кератогиалиновой ткани ногтя, являются причиной нарушения кровообращения в фаланге пальца и его функции. Отторжение ногтевой пластины от ложа сопровождается развитием гиперкератоза, направленного на восстановление дефекта в кожной складке под отторгнувшимся участком ногтя. Ороговение кожи под ногтевой пластиной может стать препятствием росту ногтей и способствовать развитию грибковой флоры [1, 2].

Ониходистрофия и микоз ногтевого ложа трудно поддаются лечению. Выраженный гиперкератоз блокирует доступ местных и поступление системных лекарственных средств через капиллярную сеть ложа в ногтевую пластину. Выбор лекарственных препаратов и тактика лечения пациентов зависят от выраженности гиперкератоза ногтевого ложа. Его площадь может быть косвенным свидетельством продолжительности патологического процесса и вероятности вовлечения в него матрикса ногтя. Для устранения излишнего разрастания фиброзной ткани ногтевого ложа необходимо ускорение роста ногтевой пластины [2–8]. Кроме того, для выработки лечебной тактики у больных с поражением ногтей необходимо учитывать возраст пациента. Преобладание гиперкератоза в современной клинической картине делает необходимым использование кератолитической

терапии. Выбор комбинированной терапии у пациентов с деструкцией ногтей зависит от состояния метаболизма, так называемой соматической отягощенности. Обоснование использования системной противогрибковой терапии, применения препаратов с кератолитическим действием, избирательного подхода в выборе тактики лечения пациентов с деструкцией ногтевой ткани с оценкой адапционно-приспособительных возможностей организма требует анализа особенностей молекулярно-биологических механизмов деструкции ногтей. Современный уровень развития медицины и биологии диктует необходимость использования новых подходов, направленных на углубленный анализ патогенеза деструкции кератогиалиновой ткани ногтей с акцентом на выявление особенностей формирования ранней стадии ониходистрофии. Особое значение могут иметь данные о нарушении связи гипонихион с сосудами ногтевого ложа, призванные предотвратить нарушения роста, развитие гиперкератоза, грибковых осложнений кожных структур и ложа ногтей.

Дисбаланс между пролиферацией клеток и программированной клеточной смертью, накопление в клетке окислителей, нарушение проницаемости митохондриальной мембраны, редокс-регуляция клеточных функций, снижение трансмембранного митохондриального потенциала могут представлять некоторые механизмы реализации клеточной смерти, в которых ведущую роль отводят факторам роста, активным формам кислорода (АФК), продуктам плазморрагии, протеинкиназам.

Реакция организма при нарушении целостности кожи и эпителия генетически детерминирована, связана с системой кроветворения, свертывания крови. Факторы роста полипептидной природы стимулируют или ингибируют пролиферацию определенных типов клеток и секретируются одними клетками, действуют на секретирующие их и другие клетки, могут способствовать разрастанию фиброзной ткани [9]. Фактор роста эпидермальный (ФРЭ), глобулярный белок массой 6,4 КДа, состоящий из 53 аминокислотных остатков, синтезируется в слюнных железах, при попадании в кровь стимулирует высвобождение кальция из костной ткани [10]. Митогенное действие ФРЭ оказывает влияние на поддержание клеточного баланса при обновлении клеток кожи в процессе апоптоза [11, 12]. Наличие рецепторов и функция ингибирования клеточного деления определяют биологические эффекты факторов роста, например, тромбоцитарного фактора роста (ТФР), который может подавлять пролиферацию клеток кишечного эпителия крыс, стимулировать дифференцировку ФРЭ и митогенез, в зависимости от плотности клеток и поступления вклеточного кальция. Факторы роста служат хемоаттрактантами, например, ТФР — для фибробластов [13]. Полипептидные ростовые факторы осуществляют межклеточную сигнализацию, действуют на подвижность клеток, в частности, эпидермальных, а также диссоциацию колоний кератиноцитов на отдельные

клетки [14, 15]. В зависимости от метаболических потребностей организма комбинация рецепторов к различным факторам роста полипептидной природы осуществляет адапционно-компенсаторную реакцию: изменяет морфологию, пролиферацию и подвижность кератиноцитов [16]. Стимулятором выработки коллагена является ТФР бета, активация которого в эпителиальных клетках проходит через тирозинкиназные рецепторы, получившие название *ras*-пути [17]. Активация роста эпителиальных клеток полипептидными факторами по фосфатидилинозитольному пути происходит уже через 1 минуту. Затем через 10–15 минут индуцируется транскрипция коллагеназы, необратимое действие на клетку происходит через 30 минут. Возможна активация эпителиальных клеток через протеинкиназу С, фосфатидилинозитольный и фосфатидилинозитол-3-киназный пути [11]. Последовательные реакции фосфорилирования и дефосфорилирования трансмембранных и внутриклеточных белков являются сигналом большинства комбинаций факторов роста и поддержания жизнеобеспечения клетки, например, усиление активности ТФР при активации повышения содержания тромбоцитов [19].

Роль внутриклеточных факторов апоптоза при увеличении продукции активных форм кислорода (АФК) выполняют цитокины [18]. Известны метаболические состояния, при которых нарушается проницаемость мембран клеток, что может привести к изменению соотношения факторов системы свертывания крови, к которым относятся продукты деградации соединительной ткани, в первую очередь, коллаген [20].

Излишнее образование кератиноподобных масс под ногтевой пластиной способствует усилению ломкости ногтей и развитию вторичных нарушений кровоснабжения. Оценка адаптивных возможностей организма при наличии гиперкератоза ногтей поможет правильно использовать лекарственные препараты с учетом их фармакодинамической активности. Особенности и закономерности реакции крови на воздействие различных факторов: радиации, токсинов, эмоционального стресса, ожогов, механических травм, инфекционных и эндокринных болезней, аллергических состояний определяются состоянием обмена и функциональными возможностями нейроэндокринного звена системы адаптации. Имеется мнение, что некоторые адаптивно-приспособительные метаболические реакции направлены на сохранение целостности кожи и эпителия [21]. При хронической гипоксии перераспределение отдельных классов липидов может явиться механизмом повреждения мембран и длинноцепочечных молекул за счет АФК, первичных и вторичных продуктов свободно-радикального окисления (СРО) липидов [22, 23 и другие]. Высказано предположение, что повышение уровня молочной кислоты и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) на фоне снижения пировиноградной кислоты может указывать на формирование лактатацидоза и снижение возможностей

адаптационно-приспособительной реакции организма на гипоксию [24–29 и другие]. Позднее появились сообщения о синдроме дисплазии соединительной ткани сердца [30], при котором в крови накапливаются 2,3-ДФГ и ПВК, что указывает на реализацию модуляционного механизма адаптации к хронической гипоксии [31]. Адаптация к хронической гипоксии может осуществляться через молекулярные структуры, имеющие свободный электрон и высокую реакционную способность [23–29, 31 и другие].

Реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) протекают, в том числе, в кератогиалиновых структурах кожи. Важнейшая роль в структурно-функциональной дестабилизации клеточных мембран принадлежит свободным радикалам липидов, белков, нуклеиновых кислот, хинонов, углеводов и АФК, таким как супероксидный анион-радикал, гидропероксидный радикал, гидроксил-радикал, пероксид водорода и гипохлорная кислота, участвующих в реакциях окисления липопротеинов сыворотки крови и фосфолипидов клеточных мембран [33, 34 и другие]. Синглетный кислород способен запускать реакцию перекисного окисления липидов (ПОЛ). Пергидроксильный радикал имеет сильные окислительные свойства и способен мигрировать через мембраны, индуцировать ПОЛ, переходить в другие формы АФК. ПОЛ может активироваться при усилении образования свободных радикалов и АФК. СРО может приводить к образованию молекулярных продуктов ПОЛ [35–40]. Например, электронная атака полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) приводит к образованию первичного молекулярного продукта ПОЛ с системой сопряженных двойных связей — диеновый конъюгат. Вторичный сопряженный продукт окисления жирных кислот, малоновый диальдегид (МДА), реагирует со многими соединениями, имеющими свободные аминогруппы, с образованием полностью нерастворимых поперечно сшитых соединений, которые не разрушаются лизосомами и остаются в виде инертных тел — конечных молекулярных продуктов ПОЛ — шиффовых оснований. Первичные и вторичные продукты ПОЛ являются естественными метаболитами и могут использоваться в дальнейших химических превращениях. Физиологические эффекты АФК и активных кислородных метаболитов (АКМ), участвующих в противомикробной защите организма, регуляции клеточной пролиферации и дифференцировке, биосинтезе белка на этапе транскрипции, полимеризации гиалуроновой кислоты, модулировании активности металлопротеиназ, генерируют разрушение протеогликанов, коллагена, клеточного скелета и деструкцию тканей [34]. Таким образом, повреждение липидов мембран и длинноцепочечных молекул за счет АФК, первичных и вторичных продуктов СРО, нарушение биосинтеза белка на этапе транскрипции и перераспределение отдельных классов липидов при хронической гипоксии могут запускать механизм деструкции тканей.

Дисбаланс системы антиоксиданты-прооксиданты может явиться одним из механизмов адаптивной метаболической реакции при деструкции тканей и заключаться в снижении устойчивости мембраны эритроцитов, накоплении модифицированных форм липидов, активации ферментов первой линии АОЗ, сопровождаться изменением содержания в крови фракций оксипролина [24–31, 40, 41]. При хронической гипоксии перекись водорода и АКФ являются стимуляторами вазодилатации, что приводит к релаксации гладкомышечных клеток сосудов и замедлению скорости кровотока, улучшая снабжение тканей кислородом. Действие внешних прооксидантов и активация эндогенных механизмов генерации активных кислородных метаболитов (АКМ) приводят к напряжению механизмов АОЗ. Продукты ПОЛ, такие как альдегиды, эпоксиды, липидные перекиси ингибируют синтез ДНК, деление клеток и, возможно, выступают в роли медиатора стресса и представляют один из его регуляторных механизмов [31].

Активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, миелопероксидазы (МПО) и других ферментов клеток крови при хронической тканевой гипоксии, сопровождающейся модуляционным механизмом адаптации, может зависеть от чувствительности специфической ферментативной системы АОЗ, примером чего служит синхронность изменения активности СОД и каталазы эритроцитов крови у пациентов с онихошизисом, онихолизисом и гиперкератозом ногтей [41]. Реакция ускорения протонирования супероксидного анион-радикала СОД осуществляется благодаря акцепторным свойствам атома меди активного центра этого фермента. При дисмутации супероксида происходит образование молекулярного кислорода и перекиси водорода [42]. Каталаза эритроцитов и миелопероксидаза лейкоцитов осуществляют в организме защиту от перекисей. Наличие у миелопероксидазы двух ковалентно связанных Fe-содержащих простетических групп при разрушении перекиси водорода этой оксидоредуктазой способствует образованию гипогалоидов, участвующих в окислении тиоэфирных групп белков [43]. Не вызывает сомнения факт ведущей роли СРО в процессе изменения кожных структур, что подтверждается увеличением содержания первичных и вторичных продуктов свободнорадикального окисления (СРО) на фоне угнетения активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты (АОЗ), что приводит к накоплению модифицированных липопротеидов [44]. У больных атопическим дерматитом, экземой, поверхностным васкулитом кожи, склеродермией отмечают увеличение содержания в крови МДА, диеновых и триеновых конъюгатов, церулоплазмينا, на фоне падения активности ферментов СОД и каталазы [45]. В то же время неоднозначные изменения активности ферментов АОЗ могут быть обнаружены у пациентов в различные стадии деструктивного процесса в ногтях [41].

Нельзя забывать, что одним из механизмов деструкции ногтей может быть процесс ускорения апоптоза эпителиальной дифференцировки клеток эпителия при повышении тканево-сосудистой проницаемости (плазматоррагии), сопровождающейся накоплением продуктов плазмы крови в основном веществе соединительной ткани и развитием последовательного процесса ее дезорганизации [20]. Повреждающее действие протеиназ, высвобождаемых из гранул нейтрофилов калликреинового и продуктами деградации фибронектина калликреинкининовой системы, может быть направлено на базальную мембрану коллагеновых, эластиновых волокон, гликопротеиды основного вещества соединительной ткани, фибронектин, гемоглобин, протеингликаны. Метаболические реакции могут модулировать ферментативное обеспечение прочности соединений между волокнами кератина, ускоряющее ороговение и апоптоз клеток ногтевой пластины [46, 47]. Дилатация и онихошизис могут привести к расщеплению пластины, отторжению от ложа, нарушению роста ногтя, деформации ложа, капиллярному стазу. Распространение протеолитических процессов в сторону ногтевого ложа или матрикса ногтя может нарушить кровоснабжение и изменить химический состав и физические свойства ногтевой пластины [48]. Отсутствие кровоснабжения в участке ногтевой пластины приводит к отторжению всего ногтя или его части. Отторжение ногтя может быть ускорено внешними факторами: физическими — травмы, обморожения, ожоги, грубый уход, отсутствие ухода и др., химическими — работа с различными химическими агентами, покрытие ногтей лаками, полимерами [49]. Протеолитические процессы, связанные с деятельностью микробной и грибковой флоры, при нарушении прочности связей между волокнами кератина могут ускорять естественный процесс апоптоза эпителиальной дифференцировки клеток [51]. Глубина поражения ногтевого ложа, выраженность гиперкератоза, площадь отторжения ногтя от ложа при ониходистрофии зависят от наличия препятствий для роста, вида грибов или микробов, колонизирующих многослойные кератогиалиновые структуры ногтя и пораженные участки ложа, а также дефицита аминокислот при различных диспротеинемических состояниях [50]. Деструкция в ростковой зоне ногтя провоцирует быстрое образование пространственных пустот между слоями кератогиалиновых клеток. Скопление кератогиалиновых клеток в зоне нарушения роста ногтевой пластины может образовать пролежень и в дальнейшем приводит к гиперкератозу.

При изучении механизма деструкции необходимо учитывать анатомические особенности ногтя и разнообразие составляющих его тканевых элементов соединительнотканной структуры кожи, которое обеспечивается основным белковым ее компонентом, коллагеном, и кератином. В образовании кератина принимают участие кератогиалиновые (зернистые) клетки базального слоя эпидермиса кожи. Основой коллагена является

аминокислота пролин, кератина — цистин. Синтез коллагена фибробластами соединительной ткани осуществляется в основном ее веществе, которое содержит гликозамингликаны, синтезируемые фибробластами, белки и полисахариды плазмы крови. Изучение их роли в патогенезе различных кожных заболеваний (склеродермия, атопический дерматит, псориаз и другие) привлекает научный интерес медиков [11, 20]. Необходимо учесть также, что конформация альфа-спирали кератина в виде плотных витков вокруг длинной оси молекулы состоит в основном из аминокислоты цистина, представляющего собой дицистеин (ди- $\alpha$ -амино- $\beta$ -тиопропионовая кислота). Метионин, цистин и цистеин осуществляют обмен серы в организме через превращение сульфгидрильной в дисульфидную группировку благодаря обратимости этой реакции [52]. Протеиноиды ногтей не растворимы в воде, являются фибриллярными или волокнистыми в форме вытянутых волокон или нитей. Изменение в тонофибрилярном аппарате базальных клеток эпидермиса в виде укорочения и утолщения тонофибрилл и тонофиламентов, нарушение процесса слияния тонофиламентов с гранулами кератогиалина может привести к нарушению процесса ороговения и образования кератина [53]. По физическим свойствам кератина могут быть твердыми и мягкими. Кератин формирует нитевидные полимеры путем сборки димеров в субъединицы филамента [54]. Считают, что процесс сборки филаментов протекает с постепенным исчезновением органоидов и ядер из клеток, что наступает апоптоз клетки, когда она полностью кератинизируется и ороговеет [55]. Эластичные  $\alpha$ -кератины, входящие в состав ногтей, обладая механической прочностью и нерастворимостью, выполняют защитную функцию. Ногтевая пластина, состоящая из плотно скрепленных клеток, имеющих остатки ядер, состоит в основном из кератина [11]. Поэтому в литературных источниках встречается еще одно название клеток ногтевой пластины (кератинизированные). Прозрачность ногтевой пластины, возможно, является необходимым условием проницаемости этой плотной структуры, располагающейся на кожном эпителии (гипонихии), особенностью которой является отсутствие кератогиалиновых клеток [56]. Клетки матрицы ногтей, онихообласты эпидермального происхождения, в процессе дифференцирования превращаются в роговое вещество. Считается, что образование ногтя происходит в проксимальной его части (ногтевой матке или матриксе), скрытой в кожной складке, именуемой задним ногтевым валиком. Ногтевой матрикс обеспечивает непрерывное образование ногтевого вещества в течение всей жизни [57]. Роговое вещество состоит из кератина, воды и жиров (соответственно, 89, 10 и 1%). В процессе ороговения ногтевая клетка теряет ядро. Гибель клеток эпидермиса связана с деградацией хроматина, в которой принимает участие эндонуклеаза. Обмен веществ в ороговевших клетках ногтя прекращается, и в отросшей его части наступает состояние апо-

птоза [10, 11]. Клетки ногтевой пластинки, имеющие остатки ядер, плотно соприкасаются между собой, создают монолитный прозрачный слой, продвигающийся от луны до верхушки ногтя, и при этом сохраняют связь с кровеносной сетью эпидермиса ногтевого ложа. Следует подчеркнуть, что процессы преобразования энергии в участках ногтя, в скрытом от света матриксе, а также прозрачном участке ногтевой пластины, могут быть различны. Преобразование энергии в организме происходит в сложных субклеточных частицах или мембранах, зависит от структуры повторяющихся единиц, встроенных в субклеточные компоненты клеток, и приспособлено для превращения различных видов энергии: химической, световой, звуковой, электрической, осмотической [58]. Кроме того, при деструкции кератина ногтей происходит нарушение физических свойств, прозрачности и нерастворимости в воде при pH 7,0 и физиологической температуре, обеспечивающееся большим процентом направленных к внешней стороне спиралевидной молекулы гидрофобных аминокислотных остатков: фенилаланина, изолейцина, валина, метионина и аланина. Периодичности в чередовании аминокислотных последовательностей кератина нет. Большое содержание цистеина и множество дисульфидных связей первичной структуры  $\alpha$ -кератинов ногтей обеспечивает водоупорность, прочность и эластичность [11, 59], что, возможно, располагает клетки ногтевой пластины, содержащие кератин, для участия света в биохимических реакциях между кератинизированными клетками и сосудистой системой ногтевого ложа. Заметим, что ороговение клетки кодируется генетически и определяется запросами тканей и регуляторными механизмами апоптоза на действие факторов внешней среды [60].

Метаболизм соединительной ткани, вероятно, можно оценить по состоянию свертывания крови и усилению ороговения клеток кожи, а также при усилении гиперкератоза ногтевого ложа. В катаболизме структур соединительной ткани существенная роль принадлежит ферментам. Об изменении метаболизма в соединительной ткани можно судить по изменению активности протеиназ, действие которых направлено на удаление продуктов деструкции и деградации тканей в организме. По мнению различных авторов, косвенным свидетельством действия эластазы на основное вещество соединительной ткани, эластиновые, коллагеновые волокна базальных мембран и белки плазмы крови является увеличение содержания оксипролина в крови [26, 31]. По влиянию на белки эластаза является одним из ферментов эндотелия и плазмы крови, действуя, в том числе, на фибринолитические белки и компоненты калликреинкининовой системы [14], что подтверждается усилением активности при различной выраженности деструкции ногтей у пациентов с онихошизисом, онихолизисом и гиперкератозом ногтевого ложа.

Структурное значение для ногтей имеют кальций, связанный с белками, а также соли кальция [61]. Мета-

болические связи между содержанием кальция в сыворотке крови и нарушениями структуры ногтевых пластин остаются до конца не изученными [63]. Интерес исследователей для оценки состояния метаболизма соединительной ткани имеет такой маркер, как содержание фракций оксипролина в периферической крови [28, 30, 40, 41, 44]. О деградации соединительнотканых структур кожи можно судить по повышению содержания гликозамингликанов в крови, усилению экскреции суммарных гликозамингликанов и уроновых кислот [44]. Косвенным показателем деструкции тканевых структур кожи, как и при других патологических процессах, может быть накопление АФК и ПОЛ, а также модификация протеинов [31, 44].

Можно полагать, что изменение метаболической картины в периферической крови и нарушение проницаемости кожного барьера связаны с разрушением мембран клеток, а высвобождение факторов роста и угнетение синтеза коллагена усиливает реакцию ороговения кожи. В этой связи перспективы повышения эффективности диагностического процесса целесообразно связывать с выяснением информативности метаболической реакции клеток крови и плазмы с оценкой не только количественных клеточных, биохимических, но и функциональных возможностей организма, которыми могут быть показатели деградации соединительной ткани и ферментодиагностика. В свою очередь, полученные результаты позволят обеспечить новые терапевтические подходы, направленные на своевременное предупреждение и эффективное лечение дистрофического процесса в ногтевых пластинах.

#### Литература

1. Сергиев А.Ю., Сергиев Ю.В., Лысенко В.И. Местная и комбинированная терапия онихомикозов / Пособие для врачей под ред. А.Ю. Сергеева. Изд. Национальной академии микологии. М.: Медиа Сфера, 2003: 32.
2. Daniel C.R., Lorizzo M., Piraccini B.M., Tosti A. Simple onycholysis // *Cutis*. 2011; 87 (5): 226–228.
3. Уразовская Е.В. Возрастные, половые и клинико-лабораторные особенности ониходистрофии вросшего ногтя первого пальца стопы // *Фундаментальные исследования. Медицинские науки*. 2012; 7, часть 2: 398–401.
4. Степанова Ж.В. Грибковые заболевания: диагностика и лечение. М.: Миклош, 2005: 124.
5. Новосёлов В.С., Новосёлов А.В. Новые аспекты в проблеме выбора современного антимикотика // *Русский медицинский журнал*. 2004; 12 (18): 1047–1051.
6. Савченко Н.В. Задачи современной терапии онихомикоза и их осуществимость // *Успехи медицинской микологии*. М., 2003; 2: 1438–1439.
7. Лысенко В.И. Новый подход к фармакоэкономической оценке лечения онихомикозов на основе КИОТОС // *Успехи медицинской микологии*. М., 2003; 2: 97–98.
8. Яковлев А.Б., Корсунская И.М., Дворянкова Е.В. Комбинированная терапия онихомикозов. М.: ИД Медпрактика, 2003: 16.

9. *Медведева Н.Д.* Роль фосфолипазы C $\gamma$  в проведении сигнала, запускаемого эпидермальным фактором роста: дис. ... докт. биол. наук: 03.00.25. СПб., 2001: 212.
10. *Авдонин П.В., Ткачук В.А.* Рецепторы и внутриклеточный кальций. М.: Наука, 1993: 288.
11. *Ленинджер А.* Основы биохимии / пер. с англ., в 3 т. М.: Мир, 1985; 1: 167–176.
12. *Кольман Я., Рем К.Г., Вирт Ю.* Наглядная биохимия. М.: Мир, 2000: 469.
13. *Аверьянов А.В., Зыков К.А.* Роль протеазно-антипротеазного дисбаланса в развитии эмфиземы легких // Респираторная медицина. 2007; 1: 29–34.
14. *Takeushi K.H.* Biochemical and immunological identification of human neutrophil elastase an nitrocellulose membranes // Biotech. Histochem. 1991; 66: 324–329.
15. *Stoker M.* Effect of scatter factor on motility of epithelial cells and fibroblasts // J. Cell. Physiol. 1991; 139: 565–569.
16. *Takahashi M., Kushida K., Hoshino H. et al.* Comparison of bone and total alkaline phosphatase activity on bone turnover during menopause and in patients with established osteoporosis // Clin. Endocrinol. 1997; 47 (2): 177–183.
17. *Nishiyama T., Sasaki T., Takeushi K. et al.* Ras p21 is involved in insulin-induced membrane ruffling and rho p21 is involved in hepatocyte growth factor – and 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induced membrane ruffling in KB cells // Mol. Cell. Biol. 1994; April, 14: 2447–2457.
18. *Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Часовских Н.Ю. и др.* Модуляция апоптоза мононуклеаров в условиях окислительного стресса // Бюллетень экспериментальной медицины и биологии. 2008; 3: 251–254.
19. *Чечина О.Е., Биктасова А.К., Сазонова Е.В. и др.* Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза // Бюллетень сибирской медицины. 2009; 2: 67–72.
20. *Главинская Т.А., Комарова В.Д., Павлова Л.Т.* Клиническое значение сывороточных цитокинов в дисфункции иммунной системы при красной волчанке // Тезисы научных работ Первого Российского конгресса дерматовенерологов. Санкт-Петербург, 23–26 сентября 2003; 1: 29–30.
21. *Segre J.A.* Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders // Journal of Clinical Investigation. 2006; 116: 1150–1158.
22. *Владимиров Ю.А.* Активные формы кислорода и азота: значение для диагностики, профилактики и терапии // Биохимия. 2004; 69 (1): 5–7.
23. *Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / под. ред. Е.Б. Меньщиковой. М.: Слово, 2006: 556.
24. *Микашинович З.И.* Общие и частные закономерности изменений метаболизма в эндокринных органах и крови при разной тяжести травматического шока и острой кровопотери: дис. ... докт. биол. наук: 03.00.04, 14.00.16. Ростов-на-Дону, 1989: 404.
25. *Микашинович З.И., Олемпиева Е.В., Шлык С.В.* Метаболические аспекты внутриутробной гипоксии у плода при сердечно-сосудистой патологии у беременных. Ростов-на-Дону, 2008: 156.
26. *Микашинович З.И., Черногузова С.А.* Протеолитические системы крови при патологических состояниях разного генеза. Ростов-на-Дону, 2007: 23.
27. *Микашинович З.И., Шепотиновский В.И.* Влияние пирувата на обменные процессы в эритроцитах после острой массивной кровопотери // Украинский биохимический журнал. 1988; 60 (2): 57–60.
28. *Микашинович З.И., Суруедова Р.А., Олемпиева Е.В.* Особенности газотранспортной системы крови у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом // Клиническая лабораторная диагностика. 2009; 10: 19–21.
29. *Микашинович З.И., Олемпиева Е.В., Терентьев В.П., Гридасова Р.А., Коваленко Т.Д.* Молекулярные механизмы развития окислительного стресса при остром инфаркте миокарда // Валеология. 2010; 2: 12–16.
30. *Василенок А.В.* Особенности кардиодинамики и метаболических процессов у детей и подростков с синдромом дисплазии соединительной ткани сердца // V научная сессия Ростовского государственного медицинского университета, посвященная 95-летию высшего медицинского образования на Дону и 80-летию РостГМУ. Ростов-на-Дону, 2010; 2: 425–427.
31. *Олемпиева Е.В.* Клинико-диагностическое значение биохимических маркеров в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний у беременных женщин: дис. ... докт. мед. наук: 14.03.10. Ростов-на-Дону, 2009: 314 с.
32. *Nakamura Y., Fukami K., Yu H., Takenaka K. et al.* Phospholipase C-delta-1 is required for skin stem cell lineage commitment // EMBO. J. 2003; Jun 16; 22 (12): 2981–2991.
33. *Владимиров Ю.А.* Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН. 1998; 7: 43–51.
34. *Дубинина Е.Е.* Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопросы медицинской химии. 2001; 46 (6): 561–581.
35. *Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б.* Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК «Наука» Интерпериодика, 2001: 343.
36. *Иванова С.А., Смирнова Л.П., Алиферова В.М. и др.* Окислительный стресс у пациентов с ремитирующей и вторично-прогрессирующей формами рассеянного склероза // Неврологический журнал. 2010; 6: 26–29.
37. *Исаков С.А., Тарасова М.А., Сонин Д.Б., Белотелова Л.К.* Свободнорадикальные процессы у больных атопическим дерматитом и экземой как мембранодеструктивные факторы патогенеза дерматозов // Тезисы научных работ Восьмого всероссийского съезда дерматовенерологов. Часть 1. Дерматология. М., 2001: 34.
38. *Klebanoff S.J.* Myeloperoxidase: friend and foe // J. Leukoc. Biol. 2005; 77: 283–289.
39. *Schmidt P.J., Ramos-Gomez M., Culotta V.C.* Alveolar antioxidant status in patient with acute respiratory distress syndrome // Eur. Respir. J. 2004; 24: 48–52.
40. *Чепурненко С.А.* Биохимические методы оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы у юношей с пролапсом митрального клапана и коррекция: автореферат дис. ... докт. мед. наук: 14.03.10. Ростов-на-Дону, 2010: 43.
41. *Уразовская Е.В., Микашинович З.И.* Биохимические маркеры в оценке стадии деструкции кератогиалиновой ткани ногтей // Здоровье и образование в XXI веке. 2012; 14 (1): 236–245.
42. *Battistoni A.* Role of prokaryotic Cu, Zn superoxide dismutase in pathogenesis // Biochem. Soc. Trans. 2003; 31 (6): 1326–1329.
43. *Айдыралиев Р.К., Азизова О.А., Миррахимов М.М. и др.* Изменение заряда поверхности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2001; 132 (8): 164–167.
44. *Биткина О.А., Копытова Т.В., Конторщикова К.Н. и др.* Уровень окислительного стресса у больных с розацеа и обоснование терапевтического применения озono-кислородной смеси // Клиническая лабораторная диагностика. 2011; 4: 13–14.
45. *Демьянова О.Б.* Состояние системы липопероксидации и антиоксидантной защиты у больных поверхностными аллергическими васкулитами кожи в процессе комплексной терапии с эмоксипином // Тезисы научных работ Восьмого всероссийского съезда дерматовенерологов. Часть 1. Дерматология. М., 2001: 34.

46. Kim S., Wong P., Coulomb P.A. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth // *Nature*. 2006; 441: 362–365.
47. Lu H., Chen J., Planko L. et al. Induction of inflammatory cytokines by a keratin mutation and their repression by a small molecule in a mouse model for EBS // *Journal of Investigative Dermatology*. 2007; 127: 2781–2789.
48. Саввина Н.А. Применение электрофореза меди синусоидальными модулированными токами и фотохромотерапии в комплексном лечении больных ониходистрофиями: автореф. дис. ... канд. мед наук: 14.00.11. СПб.: МАПО, 2007: 22.
49. Haneke E. Nail surgery // *J. Cutan. Aesthet. Surg.* 2011; 4: 163–164.
50. Uitto J., Richard G., McGrath J.A. Diseases of epidermal keratins and their linker proteins // *Experimental Cell Research*. 2007; 313: 1995–2009.
51. Ma L., Yamada S., Wirtz D., Coulombe P.A. A 'hot-spot' mutation alters the mechanical properties of keratin filament networks // *Nature Cell Biology*. 2001; 3: 503–506.
52. Збарский Б.И., Иванов И.И., Мардашев С.Р. Биологическая химия. Л.: Медицина, 1972: 582.
53. Смольянинникова В.А. Морфологическая характеристика диффузной ладонно-подошвенной кератодермии, сочетающейся с тотальной алопецией // Тезисы научных работ Первого Российского конгресса дерматовенерологов. Санкт-Петербург, 23–26 сентября 2003; 1: 118–119.
54. Frances J.D.S. The molecular Genetics of Keratin Disorders // *Am. J. Clin. Dermatol.* 2003; 4 (5): 347–364.
55. Paller A.S., Syder A.J., Chan Y.M. et al. Genetic and clinical mosaicism in a type of epidermal nevus // *New England Journal of Medicine*. 1994; 331: 1408–1415.
56. Зенин А.С., Торсуев Н.А. Учебник кожных и венерических болезней. М.: Медгиз, 1960: 380.
57. Полушкина Н.Н. Диагностический справочник дерматовенеролога. М.: АСТ, 2007: 639.
58. Вечер А.С. Основы физической биохимии. Минск: Высшая школа, 1966: 352.
59. Coulombe P.A., Omary M.B. "Hard" and "soft" principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments // *Current Opinion in Cell Biology*. 2002; 14: 110–122.
60. Иванов О.Л., Молочков В.А., Бутов Ю.С. и др. Кожные и венерические болезни. М.: Шико, 2002: 480.
61. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода // *Соросовский образовательный журнал*. 2001; 7 (6): 4–10.
62. Kempson I.M., Skinner W.M., Kirkbride P.K. Calcium distributions in human hair by ToF-SIMS // *Biochim. Biophys. Acta*. 2003; Dec. 5: 1624.
63. Oghitani S., Fujita T., Fujii Y. Nail calcium and magnesium content in relation to age and bone mineral density // *J. Bone. Miner. Metab.* 2005; 23 (4): 318–322.

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ В ПРАКТИКЕ ВРАЧЕЙ СЕМЕЙНОЙ МЕДИЦИНЫ

А.Б. ЧУХЛОВИН

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

**Резюме.** В статье изложены основные методы молекулярной диагностики, в том числе наиболее часто используемый метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), при качественной, так и при количественной оценке результатов. Приводятся примеры клинического использования методов молекулярной диагностики в гематологии, онкологии, нервных болезнях, фтизиатрии, пульмонологии, гастроэнтерологии, гепатологии, гинекологии и акушерстве, дерматологии и стоматологии. В области лабораторной инфектологии описываются возможности генодиагностики инфекций как дополняющего метода к общепринятым способам бактериологической, вирусологической и серологической диагностики. Констатируются принципы выбора биологического материала для ПЦР-диагностики на основе тропности и локализации инфекции, а также правила взятия, транспортировки и хранения материала.

**Ключевые слова:** молекулярная диагностика, полимеразная цепная реакция, генодиагностика инфекций, инфекция.

## MOLECULAR DIAGNOSIS OF INFECTION IN PRACTICE OF FAMILY PHYSICIAN

A.B. CHUHLOVIN

First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg

**Summary.** The article concerns the methods of molecular diagnosis including the most frequently used method of polymerase chain reaction (both quantitative and qualitative results evaluation). The article demonstrates the examples of clinical use of molecular diagnosis methods in hematology, oncology, neurology, phthisiatrics, pulmonology, gastroenterology, hepatology, gynecology and obstetrics, dermatology and stomatology. Method of gene diagnosis of infections is also described. This method can be used additionally to traditional methods of bacteriological, virusological and serological diagnosis. The article states the guidelines of samples taking for PCR (choice of biological material basing on localization of infection, material gathering and storage).

**Key words:** molecular diagnosis, polymerase chain reaction, gene diagnosis of infection, infection.

### Данные для корреспонденции:

Чухловин Алексей Борисович, д. м. н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ГБОУ ВПО ПСПбГМУ имени акад. И. П. Павлова  
Министерства здравоохранения РФ, e-mail: alexei.chukh@mail.ru

### 1. Основные методы молекулярной диагностики в клинике

Базовые методы молекулярной диагностики для выявления целевых участков ДНК и РНК — были разработаны в 70–80-х годах прошлого века, но их широкое клиническое применение началось только в начале 90-х годов. Любой способ ДНК-диагностики — будь то молекулярная гибридизация или полимеразная цепная реакция ДНК — основан на специфическом связывании

(в водной фазе или на поверхности) двух нитей ДНК, комплементарных (дополняющих) одна другой. Специфичность связывания нитей в спирали ДНК основана на химических связях аденина (А) с тиминном (Т) или гуанина (Г) с цитозином (Ц). Первый способ молекулярной диагностики — гибридизация нуклеиновых кислот долгое время являлся главным методом выявления

идентичных последовательностей в исследуемом препарате ДНК или РНК. Этот способ является наиболее специфичным, но недостаточно чувствительным и относительно сложным в исполнении (в связи с необходимостью применения радиоактивной метки и авторадиографии). Сейчас, несмотря на использование новых способов мечения ДНК, молекулярная гибридизация применяется нечасто, главным образом при анализе специфических продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) изучаемой ДНК.

Наиболее часто в клинических условиях используют метод ПЦР. Исследуемую ДНК можно выделить практически из любого биоматериала. Основное требование к выделенной ДНК — относительная чистота, стандартный выход продукта, сохранность и отсутствие дополнительных загрязнений (в том числе — ДНК из других проб). Используя простой принцип комплементарности (связи А-Т и Г-Ц), химики синтезируют короткие цепочки нуклеотидов с заведомо известным составом (праймеры). По принципу комплементарности эти праймеры (или ДНК-зонды) «находят» искомые участки генов. От этих точек гибридизации и происходит достройка парных нитей ДНК. Этот процесс требует наличия в реакционной смеси пурин- и пиримидинтрифосфатов (АТФ, ТТФ, ГТФ и ЦТФ), а также присутствия ДНК-полимеразы, которая присоединяет их к существующей цепочке одной нити ДНК в соответствии с последовательностью оснований во второй нити ДНК. При первом цикле ПЦР получается некоторое число ампликонов различной длины, которые служат субстратом во втором цикле реакции, где количество специфических продуктов удваивается еще раз. В каждом из последующих циклов (всего — до 35–40) происходит двукратное возрастание числа специфических продуктов ПЦР-ампликонов — до сотен тысяч копий избранного участка гена. Это уже количества, достаточные для выявления конкретного гена (например — бактериального или вирусного).

Полимеразная цепная реакция ДНК проводится в специальном приборе (термоциклере или амплификаторе), который согласно специальной программе изменяет температуру в рабочих ячейках, держит ее в течение заданного времени и переходит к следующему этапу.

**Каждый цикл ПЦР обычно состоит из трех этапов:**

- А) **Нагрев до 95 °С.** При этом выделенные молекулы ДНК подвергаются денатурации, т.е. происходит разделение ДНК на две нити.
- Б) **Охлаждение** до нужной температуры (зависит от характеристик ДНК-зондов — обычно 48–66 °С). При этом, если в образце есть целевые участки ДНК, то синтетические ДНК-зонды (праймеры длиной 15–30 нуклеотидов) связываются (гибридуются) с комплементарными участками ДНК, например хламидии или герпесвируса. Точки присоединения праймеров ограничивают искомые

участки генов, определяя размеры образующегося продукта ПЦР.

- В) **Нагрев до 72 °С.** Эта температура оптимальна для фермента Таq ДНК-полимеразы, которая начинает быстро достраивать одну и другую цепочку ПЦР продукта, начиная с места фиксации, соответственно, одного и второго ДНК-зонда. Этот процесс называется элонгацией (т.е. удлинением). Сами же продукты ПЦР именуют ампликонами.

Этот циклический процесс повторяют 30–40 раз, и в результате получают сотни тысяч копий искомого участка гена. Эти геноспецифические продукты ПЦР должны иметь одинаковую длину.

## 2. Учет результатов ПЦР

### 2.1. Качественная оценка (электрофоретический метод)

Во многих случаях при ПЦР-диагностике достаточно получить ответ «да» или «нет», как, например, при первичном выявлении инфекционных возбудителей, судебно-медицинских исследованиях, определении генных мутаций, специфических онкогенов и др. Обычным способом разделения продуктов ПЦР и идентификации специфического гена является электрофорез в агарозном или (реже) в полиакриламидном геле. Специфический продукт ПЦР при этом виден как четкая полоска, находящаяся на уровне положительного контроля. Методики электрофоретического разделения достаточно стандартизированы и дают вполне воспроизводимые результаты. Результат должен быть однозначно отрицательным в контроле без ДНК и четко положительным — в пробе с ДНК, содержащей искомый участок гена. Положительный контроль может представлять собой целевую ДНК, или участок гена, клонированный в плазмиде или амплифицированный с помощью ПЦР.

Для учета результатов качественной ПЦР может быть использован и метод флуоресцентной детекции (так называемый «flash-метод»). Поскольку здесь нет необходимости и в электрофоретическом оборудовании, то очевидна существенная экономия рабочих зон и реагентов для лаборатории.

Методы учета результатов ПЦР без применения электрофореза наиболее уместны и выгодны для многопрофильных лабораторий, где ПЦР-методы составляют лишь небольшую часть производственного процесса. В таких крупных лабораториях часто определяется лишь ограниченный круг наиболее востребованных микроорганизмов. На российском рынке предлагается целый ряд «флэш»-наборов для диагностики заболеваний, передающихся половым путем, и ряда вирусных инфекций. Этот ассортимент патогенов вполне достаточен для многих больничных лабораторий, и они могут с начала своей деятельности сделать акцент на таких методах анализа.

## 2.2. Количественная оценка результатов ПЦР

Методики количественной ПЦР были разработаны, прежде всего, для оценки динамики вирусных инфекций и эффективности проводимой терапии. Наиболее актуальны эти вопросы при обследовании пациентов с хроническими инфекциями (гепатиты В и С, вирус иммунодефицита человека и др.). При этом исходят из того, что накопление продуктов ПЦР (ампликонов) пропорционально содержанию копий искомого гена в исследуемой пробе.

Естественно, учет результатов количественной ПЦР можно проводить и с помощью гель-электрофореза с анализом интенсивности специфических сигналов ПЦР. Обязательным условием правильной количественной оценки результатов ПЦР являются надежные положительные контрольные пробы с известным содержанием копий искомого гена (например, 1000 копий гена гепатита С на 1 реакцию). Ряд последовательных разведений количественного контроля дает возможность построить калибровочные кривые, по которым можно оценивать содержание генокопий в клинических образцах.

Ключевым достижением в проведении количественной ПЦР стала разработка флуоресцентных ДНК-зондов, которые добавляются в реакционную смесь наряду с «обычными» праймерами и дают возможность отслеживания хода ПЦР во времени (т. н. real-time PCR), которая была в 1993–1994 гг. внедрена в соответствующих приборах и диагностических системах (принцип TaqMan). Существует еще несколько методов конструирования ДНК-зондов для количественной ПЦР.

Методология TaqMan предусматривает синтез флуоресцентных ДНК-зондов, специфичных к средней части ампликона (между праймерами) и имеющих по концам две метки. Одна из них — флуоресцентная молекула, другая — молекула-гаситель этой флуоресценции. Таq-полимераза в ходе ПЦР не только достраивает нуклеотидную цепочку, но и разрушает связанный флуоресцентный зонд. При этом флуоресцирующая метка выходит в свободное состояние, освобождаясь от влияния гасителя. Поэтому интенсивность флуоресценции по мере амплификации продуктов ПЦР возрастает пропорционально числу ампликонов и, соответственно, числу копий исходной ДНК. Специальный прибор, являющийся гибридом термоблока-амплификатора и флуориметра, осуществляет регулярные замеры флуоресценции в каждой пробирке (принцип real-time-ПЦР). В результате после 20–40 циклов ПЦР для каждого образца получают индивидуальные кривые. По калибровочным кривым с контрольными образцами возможно вычислить, сколько копий искомого гена содержится в изучаемом образце.

Важная особенность проведения ПЦР флуоресцентным методом состоит в том, что пробирки с ПЦР-смесью не нужно открывать при учете результатов. Благодаря

этому уменьшается вероятность загрязнения помещений продуктами амплификации, и отпадает необходимость выделения специальных рабочих зон для проведения электрофореза.

## 3. Некоторые общие принципы молекулярной диагностики инфекционных агентов

1. Любая молекулярно-биологическая диагностика имеет геноспецифический характер. В силу этого генодиагностика инфекций является дополняющим методом к общепринятым способам бактериологической, вирусологической и серологической диагностики, каждый из которых имеет свои преимущества и ограничения. Поэтому лучше всего использовать по возможности все указанные критерии для вынесения решений по тактике дальнейшей терапии [5, 14].
2. В ранние сроки развития острой инфекции (например, вирусных гепатитов) выявление специфических вирусных генов может быть основным признаком инфекционного процесса. Кроме того, генодиагностика незаменима при выявлении некультивируемых или плохо культивируемых инфекционных агентов (анаэробная флора, вирусы, L-формы бактерий, например, *M. tuberculosis*).
3. Источник биологического материала для ПЦР-диагностики должен определяться тропностью и локализацией инфекции. В соответствии с этим, клиническими образцами могут быть: периферическая кровь, костный мозг, плазма крови, цереброспинальная жидкость, дуоденальный сок, бронхоальвеолярный лаваж, мазки, соскобы и биоптаты слизистых, слюна и т. д. Взятие материала должно проводиться в соответствии с предполагаемой локализацией процесса.
4. В случаях выявления инфекционного агента у больного желательно провести повторные определения его в аналогичных образцах. Кроме того, при наличии возможности необходимо провести полуколичественную или количественную оценку содержания данного инфекционного агента (как это делается при гепатите С, герпесвирусных и ряде урогенитальных инфекций), с целью уточнения интенсивности инфекции и, в последующем, для контроля проведенной терапии.

## 4. Практические аспекты проведения ПЦР в клинике

Следует знать, что минимальный срок выполнения единичного ПЦР-анализа — 4–6 часов. Однако в реальной деятельности лаборатории, когда нужно обрабатывать множество проб параллельно, обычное ПЦР-исследование занимает 24–48 часов. Если все же надо провести экстренный анализ отдельного образца, то при этом значительно увеличиваются трудозатраты и расход лабораторных материалов в расчете на одну пробу. По-

этому выполнение срочного анализа единичных образцов обходится в 2–4 раза дороже, чем исследования, проводимые в обычном режиме.

#### 4.1. Правила взятия и хранения материала до поступления в лабораторию

Для исключения перекрестного загрязнения забор материала (крови, смывов, соскобов и др.) проводится в пластиковые одноразовые микропробирки с консервантом, которые выдаются в лаборатории. Оптимальный объем пробы крови — 1 мл (2/3 объема пробирки) на 0,1 мл консерванта. Мазки и соскобы собирают в пробирки с 0,2 мл консерванта. Врачи и клинические подразделения, где берут клинические образцы для ПЦР, должны иметь небольшой запас таких чистых пластиковых микропробирок типа Эппендорф (1,5–2,0 мл) с раствором ЭДТА. Это вещество, связывая кальций, является антикоагулянтом и, кроме того, защищает ДНК от разрушения. Если материал берется одноразовыми зондами (например, в гинекологии или урологии), то полученный материал вместе с кончиком зонда можно оставить в пробирке и закрыть ее. Образцы крови для анализа можно забирать и в вакуумные шприцы (типа Monovette) с ЭДТА.

На каждой пробирке с материалом должен стоять номер (и/или фамилия больного), который пишется в бланке направления на анализ. И пробирки, и бланки направлений и, при необходимости, зонды для взятия проб обычно выдают ПЦР-лаборатории, с которыми сотрудничает данная клиника.

Взятие биоматериала производят только в резиновых перчатках одноразовым инструментарием (шприцы, соответствующие зонды, пробоотборники и пр.). Каждый образец хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

**Внимание: запрещается добавлять гепарин в пробирки для ПЦР-исследований.**

К каждой пробе должно прилагаться заполненное направление (бланк выдается в лаборатории). В бланке обязательно надо написать номер пробирки с образцом, фамилию больного и название отделения (кому отдать ответ).

Материал должен быть взят в течение рабочего дня и не позже, чем через сутки (24 часа) доставлен в лабораторию. Взятый материал до транспортировки в лабораторию должен храниться при 0 ... +4 °С.

Если нет возможности доставить образцы в лабораторию в течение суток, то допустимо заморозить биоматериал при –20 °С и затем доставить в охлажденном виде в лабораторию.

#### 5. Применение ПЦР-диагностики при различных заболеваниях

В настоящее время отечественные фирмы-производители предлагают широкий выбор реагентов для ПЦР-диагностики более чем 50 различных инфекционных

агентов. Однако многие молекулярно-биологические лаборатории имеют свою специализацию, методы и особенности работы, в зависимости от запросов тех клиник, с которыми они сотрудничают. Поэтому в дальнейшем представляется уместным изложить несколько типовых схем ПЦР-обследования для разных групп заболеваний [4, 17].

##### 5.1. Гематология и онкология

Общеизвестно, что интенсивная цитостатическая терапия, наряду с противоопухолевым эффектом, оказывает выраженное иммунодепрессивное действие. В связи с этим у больных необходимо регулярно (иммунологическими и ПЦР-методами) контролировать наличие системных или локальных инфекций, прежде всего вирусной природы, которые часто активируются при массивной цитостатической терапии. Так, инфекция цитомегаловирусом или парвовирусом В19 может вызвать выраженное подавление гемопоэза. Вирус Эпштейна–Барр иногда сопутствует возникновению лимфом. Это особенно важно при использовании препаратов, подавляющих иммунитет (например, циклоспорина А), после пересадки костного мозга. Кроме того, после многократных трансфузий эритроцитов или тромбоцитов этих больных нужно периодически проверять на наличие вирусов гепатитов В и С в плазме крови [3].

##### 5.2. Нервные болезни

В неврологической практике часто возникают вопросы дифференциальной диагностики энцефалитов и менингитов, а также задачи исключения нейроинфекций у больных с неврологическими заболеваниями иного генеза. Прежде всего, здесь стоит задача выявления вирусных инфекций (или их активации). Известно, что многие вирусы группы герпеса являются нейротропными. Так, цитомегаловирус, вирусы простого герпеса, опоясывающего лишая и др. у многих людей десятилетиями персистируют в организме без особых клинических симптомов. Нарастание титров специфических антител класса IgM (признак свежей инфекции) в сочетании с соответствующей клиникой и положительной ПЦР-реакцией на данный вирус ставит вопрос о проведении антивирусной терапии. Поэтому наиболее востребованными в неврологической клинике являются ПЦР ДНК цитомегаловируса, простого герпеса, вируса Эпштейна–Барр, а также *Varicella Zoster* (опоясывающего лишая). В ряде случаев требуется и определение ДНК герпесвируса VI типа, который является вероятной причиной «синдрома хронической усталости» и может вызывать пневмонии. Кроме того, в сомнительных случаях необходимо исключение хламидийной инфекции и токсоплазмоза у больных. Особое значение (при соответствующем анамнезе) имеет детекция ДНК боррелий — трепонем, переносимых клещами и вызывающих эндемичное заболевание — клещевой боррелиоз с кожной и неврологической симптоматикой. Оптимальный

вариант: проведение серологических исследований (выявление специфических антител, особенно нарастания титра антител класса IgM) с применением ПЦР-диагностики в качестве уточняющего метода.

При ряде демиелинизирующих заболеваний (например, рассеянном склерозе) клиническая картина может быть сходной с таковой при подострых и хронических нейроинфекциях. В этих ситуациях, с целью дифференциальной диагностики, проводится ПЦР-обследование на наличие вирусов группы герпеса и боррелий в цереброспинальной жидкости.

### 5.3. Фтизиатрия и пульмонология

Вопросы своевременной диагностики туберкулеза стали очень актуальными в последние годы, в связи с ростом заболеваемости микобактериальными инфекциями. Безусловно, «золотым стандартом» во фтизиатрии является серологическая и бактериологическая диагностика. Однако наряду с классическими лабораторными критериями ПЦР-диагностика туберкулеза также начинает применяться в качестве подтверждающего метода выявления туберкулеза, особенно при внелегочной локализации очагов поражения. Имеется значительный выбор коммерческих тест-систем для выявления туберкулезной ДНК *M. tuberculosis*, *M. bovis* и комплексной диагностики этих видов. Безусловно, эти системы весьма специфичны и чувствительны, однако при недостаточно тщательном режиме лизиса клеток в клинических образцах могут получаться ложноотрицательные результаты. Впрочем, результаты классических обследований также не всегда выявляют наличие инфекции. Так что в диагностике туберкулеза, особенно в неясных случаях, необходимо комплексно оценивать данные бактериологических, серологических и молекулярно-биологических исследований.

В последние годы появились также способы генодиагностики штаммов микобактерий, резистентных к противотуберкулезным препаратам. В частности, устойчивость палочки Коха к изониазиду или рифампицину связана с мутациями соответствующих микробных генов. Для выявления «генов резистентности» необходимо вырастить чистую культуру туберкулезных бацилл от данного больного. Из бактерий выделяют ДНК и подвергают амплификации (в варианте мультиплексной ПЦР) с целью получить сегменты генов, которые могут содержать эти мутации. Затем эти продукты ПЦР дополнительно подвергают гибридизации на носителях (биочипах) с набором ДНК-зондов, специфичных к искомым мутациям [8]. Положительный результат гибридизации говорит о наличии мутации, вызывающей устойчивость к обычному лечению, в связи с чем больному следует назначить другой препарат.

Выявление патогенных бактерий в мокроте, бронхоальвеолярном лаваже и др. при неспецифических бронхолегочных заболеваниях (бронхитах, пневмониях) обычно проводится стандартными бактериологическими

и иммунологическими методами. Однако при подозрении на вирусные инфекции можно и нужно проводить соответствующую ПЦР-диагностику (например, на вирусы гриппа, парагриппа, респираторно-синцициального вируса и др.). Особое значение имеет своевременная диагностика патогенных грибов, в частности — рода *Aspergillus*, *Candida*, *Mucor* и др. у маленьких детей, лиц пожилого возраста и больных с подавленным иммунитетом (например, после интенсивной цитостатической терапии при онкологических заболеваниях). Здесь методы ПЦР ДНК по скорости выполнения, точности и специфичности диагностики существенно превосходят обычные способы исследования, применяемые в микологии (микроскопию, культивирование, определение специфических галактоманнанов в плазме крови и т. д.).

### 5.4. Гастроэнтерология и гепатология

При выявлении наиболее частых микробных патогенов желудочно-кишечного тракта, безусловно, доминируют классические бактериологические методы. Это касается стандартных способов диагностики колибактериоза, сальмонеллеза, кампилобактериоза, основанных на культивировании микроорганизмов, выявлении микробных антигенов и оценке титров специфических антител. ПЦР-диагностика инфекционных заболеваний кишечника применяется нечасто, например, для диагностики патогенных грибов, анаэробных бактерий или вирусных заболеваний (в частности, энтеровирусной инфекции).

Кроме того, может проводиться определение генных вариантов микроорганизмов с целью выявления особо патогенных генотипов (например — стрептококка, *E. Coli* и др.). В последние годы разрабатываются методы выявления мутаций, ведущих к лекарственной резистентности ряда микробов к специфической химиотерапии. Сейчас доступны отечественные тест-системы для ПЦР-диагностики генов устойчивости к тетрациклину (*tetM*) и эритромицину (*ErmB*) в популяциях уреоплазмы. Следует, правда, отметить, что выявление генов резистентности надо проводить в чистых культурах микроорганизмов, что значительно удлиняет и удорожает исследование. Поэтому обычные биологические тесты с подавлением роста бактерий являются стандартными и общепринятыми.

Существенное значение генодиагностика имеет при выявлении возбудителя геликобактериоза (*Helicobacter pylori*). Прямое обнаружение бактериальной ДНК в локальных пробах и слюне является фактором повышенного риска язвенной болезни желудка и ее осложнений. При этом необходимо также определять патогенные штаммы этого микроорганизма (позитивные по *cag*, *ure*, *vac* и ряду других генов). Как известно, повышенная патогенность микроорганизмов связана с наличием у них специфических факторов, которыми могут быть клеточные токсины, ферменты, разрушающие окружающие ткани, белки, подавляющие иммунный ответ, и др. Вы-

работка этих факторов контролируется соответствующими генами, которые часто образуют в геноме так называемые «островки патогенности».

Однако наиболее важным приложением генодиагностики в гепатологии является детекция вирусных гепатитов. При этом гепатит В диагностируется достаточно уверенно по клинике, анамнезу и с помощью методов иммунодиагностики (по наличию специфических антител и антигенов в сыворотке). Молекулярно-биологические методы выявления инфекции здесь имеют лишь уточняющий характер. Тем не менее, в процессе длительной терапии гепатита В необходимо регулярно оценивать содержание вируса в плазме крови («вирусную нагрузку»), а также наличие его в пораженных тканях печени, с целью определения эффекта от проводимого лечения.

Что касается гепатита С, то первичная диагностика здесь основана на выявлении специфических антител. Однако от момента инфекции до выработки антител проходит значительное время (так называемое «серонегативное окно») длительностью до 7 недель. Поэтому обнаружение вирусной РНК в плазме больных на ранних этапах инфекции — важный критерий диагноза этого, нередко фатального, заболевания с полиорганным характером поражения. Особую роль играет эпидемиологическая опасность гепатита С, что диктует необходимость ПЦР-скрининга в группах высокого риска (в частности, у больных при многократных гемотрансфузиях, а также среди «шприцевых» наркоманов) [2].

Подобно ВИЧ-1 и вирусу гриппа, вирус гепатита С (ВГС) обладает значительной генетической вариабельностью. В ходе серии генных мутаций возникают варианты с измененным антигенным составом, что затрудняет серологическую диагностику. Поэтому детекция вирусной РНК методом ПЦР является единственным методом ранней диагностики этого заболевания.

Когда решается вопрос о терапии ВГС и ее длительности, то прогностически благоприятными факторами считаются молодой возраст больного, низкий уровень РНК ВГС в плазме крови (менее 10<sup>4</sup> генокопий в мл плазмы), а также определенные генотипы вируса (2 или 3). Генотипирование ВГС проводится по определенным участкам генома (в частности, 5'UTR). Наиболее часто в Европе встречаются 6 типов вируса, из которых в России тип 1b является прогностически менее благоприятным, в связи с более частым развитием цирроза печени и худшим ответом на антивирусную терапию [9].

### 5.5. Гинекология и акушерство

Считается, что так называемые «скрытые» инфекции мочеполовой системы отражают общий патологический фон и могут иметь существенное значение в развитии локальных хронических процессов. При этом повышается риск хронических воспалительных процессов мочеполовой системы и их осложнений, ведущих к бесплодию. Во всяком случае, их выявление означает,

что у таких больных (как мужчин, так и женщин) чаще развиваются функциональные нарушения уrogenитальной системы, и часто нуждается в соответствующем медикаментозном лечении.

Обычно обследование на скрытые инфекции включает следующие микроорганизмы или некоторые из них:

- Хламидии (*Chl. trachomatis*, *Chl. psittaci*)
- Микоплазмы (*M. genitalium*, *M. hominis*, *Ureaplasma urealytica*)
- Гарднереллы (*G. vaginalis*)
- Трихомонады (*Trichomonas vaginalis*)
- Гонококк (*Neisseria gonorrhoeae*)
- Цитомегаловирус
- Герпесвирус
- Папилломавирус (онкогенные генотипы)

Наиболее распространенные из этих патогенов выявляются методом ПЦР с помощью тест-систем отечественной разработки. Материалом служат мазки и соскобы со слизистых. В настоящее время ПЦР-исследования (наряду с микробиологическими методами) вошли в стандартные схемы диагностики и контроля терапии при этих состояниях.

Одним из проявлений скрытых уrogenитальных инфекций у женщин является вагиноз, который отражает длительно существующий дисбаланс бактериальной флоры со снижением доли нормальной (лактобациллярной) флоры с появлением анаэробных микроорганизмов, изменением (защелачиванием) химической среды вагинального секрета и в связи с этим — нарушенной способностью к нормальному вынашиванию плода. Соответствующая диагностика состоит в бактериологическом исследовании вагинального секрета на наличие нескольких маркерных видов бактерий, включая лактобациллы (в норме — основная микрофлора), кокковые формы, гарднереллы, порфиромонас, клостридии, коринебактерии, микоплазмы и др. Прямая микроскопия образцов не всегда информативна, а культуральные методы часто не выявляют целевые микроорганизмы, особенно — анаэробные виды.

Поэтому для выявления ДНК различных микроорганизмов вагинальной флоры (независимо от их жизнеспособности в культуре), в последние годы разработан диагностический набор «Фемофлор» (фирма «ДНК-Технология»), который позволяет провести количественную оценку до 15 отдельных видов патологической флоры по отношению к числу нормальных микроорганизмов (лактобацилл). Объективность оценки дисбаланса микрофлоры при ДНК-диагностике здесь определяется через количественные отношения различных микробных популяций. Предстоит, однако, подробная клиническая проверка этого методического подхода для сопоставления получаемых результатов с клинической картиной и исходами данного патологического состояния.

Выявление гонококковой инфекции обычно проводится посредством обычных бактериологических мето-

дов. В сомнительных случаях требуется подтверждающая диагностика методом ПЦР.

Выявление пре- и перинатальных инфекций в родовых отделениях часто поднимает вопрос о наличии активных инфекций, особенно при экспозиции плода на ранних стадиях развития [11].

Эту группу инфекционных агентов, опасных для развивающегося плода, часто обозначают сокращением TORCH, по их начальным буквам:

1. *Toxoplasma gondii*
2. Вирус краснухи (*Rubeola*)
3. Цитомегаловирус (*Cytomegalovirus*)
4. Герпесвирус (*Herpesvirus*)

Кроме того, в расширенный список входит, по мнению Holzgreve (1995), еще ряд инфекционных агентов:

1. Парвовирус (в особенности — подвид В19)
2. Вирус Коксаки В
3. Вирусы гриппа и парагриппа
4. Патогенные штаммы лептоспиры
5. Листерия (*Listeria monocytogenes*)
6. Бледная трепонема

При бактериальных заболеваниях основным видом диагностики являются бактериологические и серологические исследования, тогда как молекулярно-биологическая диагностика обычно дополняет их результаты. Что касается вопросов выявления патогенных вирусов, то здесь, наряду с определением специфических вирусных антигенов и противовирусных антител (особенно антител класса IgM, свидетельствующих о свежей инфекции), большое значение приобрела молекулярная диагностика. В частности, ряд отечественных и зарубежных фирм выпускают эффективные наборы для ПЦР-диагностики вируса простого герпеса, цитомегаловируса, краснухи и др.

### 5.6. Онкогинекология

Особое место в онкогинекологии занимает диагностика вируса папилломы человека (ВПЧ). В целом, диагностика папилломатоза стала достоверной лишь с появлением методик, основанных на детекции нуклеиновых кислот, — гибридизации ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ, англ. HPV) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). В зависимости от целей и возможностей лабораторий, широко применяются различные техники ПЦР и/или ДНК-ДНК гибридизации. Результат оценивается по наличию радиоактивной (сейчас применяется реже) или ферментативной метки. Среди подобных методик выделяется НС II (hybrid capture II), отличающаяся простотой выполнения и специфичностью. В целом следует отметить, что методики, основанные на реакции гибридизации, менее чувствительны к случайным загрязнениям образцов в сравнении с ПЦР-диагностикой, что снижает частоту ложноположительных результатов.

Из десятков штаммов ВПЧ около 1/3 считаются онкогенными, приводя к развитию рака шейки матки, гор-

тани и других эпителиальных опухолей. Поэтому генодиагностика ВПЧ (в клетках, взятых с шейки матки) входит в число обязательных исследований при оценке степени онкологического риска у женщин и мужчин. На протяжении ряда лет широко применяются диагностические наборы, выявляющие ДНК ВПЧ 16, 18, 6, 11 и ряда других онкогенных типов, которые вполне пригодны для рутинных исследований. Более точная и чувствительная диагностика возможна с применением методов молекулярной гибридизации ДНК со специфическими ДНК-зондами, соответствующими онкогенам ВПЧ и [6].

Большое практическое значение получило генетическое типирование ВПЧ. Как известно, этот ДНК-содержащий вирус принадлежит к семейству Папова-вирусов (сокращение от papilloma, polyoma and simian vacuolating viruses). Известны более 80 типов ВПЧ, обладающих различной тропностью к эпителию верхних дыхательных путей и аногенитальной системы и различным уровнем онкогенности. Среди них выделяют субтипы «низкого» и «высокого» онкогенного риска. ВПЧ «низкого риска». Так, ВПЧ типов 6, 11, 40, 42, 43, 44 обычно ассоциированы с доброкачественными экзофитными бородавками, тогда как ВПЧ «высокого риска» (типы 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 56, 58) обнаруживаются в 90–95% случаев преинвазивных и инвазивных форм рака шейки матки (РШМ). Частота возникновения РШМ у женщин, инфицированных ВПЧ «высокого риска», возрастает в среднем в 30 раз по сравнению с незагрязненной популяцией, поэтому данный контингент обследуемых требует особенно пристального мониторинга, особенно в группах среднего возраста.

Значительную актуальность приобретает обнаружение онкогенных ВПЧ, интегрированных в геном инфицированных клеток. Если вирус существует в эпизодной (внехромосомной) форме, то инфекция может с годами прекратиться. При интеграции же вирусного генома в хромосомы эпителиальных клеток и персистенции инфекции в возрасте после 40 лет резко возрастает опасность злокачественного перерождения и развития ракового заболевания. В патогенетическом аспекте наиболее важна диагностика ранних генов *E 6* и *E 7* в геноме вирусов «высокого риска» (тип 16, 18, 31 и др.), которые связаны с персистенцией ВПЧ-инфекции и ее осложнениями и выявляются во всех случаях рака шейки матки, так как, по современным данным, подавляют действие гена *p53* — ключевого антионкогена [7]. Описан ряд ПЦР-методик генотипирования ВПЧ и экспрессии генов «интеграции» в геном [1]. Используемые отечественными авторами аналитические подходы не менее чувствительны и специфичны, чем стандартная методика (НСА-1) для выявления субтипов ВПЧ при различных клинических формах дисплазии шейки матки. Они большей частью основаны на методах гибридизации РНК или ДНК ВПЧ с *E 7*-специфичными зондами [18].

Кроме вариабельности генов *E 6–E 7* ВПЧ, изучается и изменчивость гена *E 2* — ингибитора транскрипции *E 6–E 7*. При этом сравнительная оценка интенсивности геноспецифических сигналов *E 2* и *E 6* (после проведения ПЦР) позволяет ориентировочно оценить статус интегрированности ВПЧ в геном инфицированных клеток [10].

### 5.7. Урология

Мочевые инфекции являются нередкой причиной развития почечной недостаточности, и некоторые патогены представляют собой важный фактор возникновения мочекаменной болезни. Наиболее часто в мочевыводящих путях выявляются следующие патогенные микроорганизмы:

- *Escherichia coli*
- Другие энтеробактерии (*Proteus, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter*)
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterococcus*
- *Staphylococcus saprophyticus*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus agalactiae* (группа В) — в основном у женщин
- *Candida spp.*

Реже встречаются такие патогенные и условно патогенные организмы, как *Corynebacterium urealyticum, Haemophilus influenzae, H. Parainfluenzae, Blastomyces dermatitidis,*

Наиболее часто в клинике исследуют наличие *Neisseria gonorrhoeae*. Гонококк легко выявляется с помощью микроскопии и другими бактериологическими методами. ПЦР-диагностика ДНК гонококков также проводится довольно часто, но ее эффективность значительно ниже ожидаемой. Причиной этого может быть ранняя антибиотикотерапия больных в высоких дозах, что резко снижает выявляемость любых патогенов, чувствительных к данному антибактериальному препарату. Другим микроорганизмом, поиск которого весьма актуален, особенно в последние годы, является *Mycobacterium tuberculosis*, в диагностике которой молекулярно-биологический метод играет уточняющую роль, после классических способов бактериологического исследования.

Микробные факторы уропатогенности могут лежать в основе существенных механизмов, способствующих образованию кристаллов на слизистых мочевыводящих путей и возникновению уролитиаза. Так, *Proteus mirabilis* и *Corynebacterium urealyticum* вырабатывают значительные количества уреазы — фермента, расщепляющего мочевины с образованием ионов аммония, повышением щелочности мочи, что ведет к облегченному росту бактерий и образованию камней, а также отложениям солей в мочевом пузыре. В частности, показано, что уреазопозитивные штаммы бактерий способствуют повышению рН мочи, что ведет к повышенному риску формирования

оксалатных и струвитных камней. К таковым, в частности, относится *Proteus mirabilis*, который может образовывать биопленки, особенно на поверхности мочевых катетеров. Интенсивный рост протей приводит к быстрому осаждению кальциевых конкрементов в просвете катетера и появлению потенциального источника восходящей мочевой инфекции [20]. Уреазопозитивные штаммы *Proteus mirabilis* способствуют защелачиванию мочи, что создает условия для камнеобразования.

Другими, более редкими микроорганизмами-продуцентами уреазы, являются *Corynebacterium pseudogenitalium* [19]. Они чаще встречаются у больных пожилого возраста и ассоциированы с длительно текущим уролитиазом.

Непосредственную роль конкретных инфекционных возбудителей в процессах камнеобразования довольно сложно проследить, поскольку патогенные микроорганизмы в ходе формирования конкрементов могут находиться как на их поверхности, так и в глубине этих структур (в качестве примесных компонентов). По этой причине до сих пор не установлена роль так называемых «нанобактерий» (кальций-содержащих частиц размерами менее 0,5 мкм), обнаруженных в составе почечных камней. Первоначальные исследования (1987–2001 гг.) выявили бактериальную ДНК, ассоциированную с камнями, и этим бактериям были даже присвоены названия (*Nanobacteria spp.*). Предполагалось, что нанобактерии могут играть определенную роль в камнеобразовании, поскольку они были связаны с формированием карбонатных отложений. Однако последующие изыскания не подтвердили эту теорию, поскольку выделенные микроорганизмы уже были известны ранее как сапрофитная флора. Так что вопрос о наличии и роли нанобактерий в мочевой патологии пока еще находится на уровне дискуссии.

С другой стороны, весьма перспективным представляется исследование биологической роли других известных микроорганизмов как факторов защиты от уролитиаза. К ним относится, в частности, *Oxalobacter formigenes*, которая, находясь в кишечнике, вызывает расщепление оксалата и, тем самым, снижает его уровень в экскретах организма, в том числе и в моче [15]. Экспериментальное применение такого рода бактерий с целью реколонизации организма (например, после антибиотикотерапии), наряду с сокращением оксалатов в диете, может стать важным средством профилактики камнеобразования в мочевой системе.

Таким образом, в урологической практике имеет смысл поиск микробных маркеров, связанных с повышением щелочности мочи и риском развития камней. Поскольку многие из этих бактерий культивируются недостаточно эффективно, то применение ДНК-диагностики для выявления и количественной оценки этих бактерий в моче и на слизистых является перспективным способом оценки факторов риска уролитиаза и других урологических заболеваний.

### 5.8. Дерматология

Совершенствование способов диагностики и контроля лечения грибковых инфекций (микозов) имеет большое значение в связи с высокой частотой заболеваемости среди населения всех возрастных групп. Дифференциальная диагностика грибковых поражений кожи и ногтей имеет особую важность, в связи с различиями схем лечения при микозах различного генеза. В настоящее время применяются различные способы диагностики грибковых заболеваний кожи и ногтей пластинок.

Классическая симптоматика микозов обычно дает возможность диагностировать заболевание по клиническим признакам. Однако во многих случаях симптомы болезни бывают слабо выражены, особенно в начальной стадии заболевания или после курса лечения. Микроскопия исследуемых образцов кожи и ее придатков не всегда точна при малой интенсивности инфекции или глубокоом поражении тканей.

«Золотым стандартом» в медицинской микологии является точный и надежный способ культивирования грибов в специальных микробиологических средах. Его недостаток — большая длительность культивирования (до 4 недель) и, в ряде случаев, отсутствие роста грибка на фоне проводимого лечения.

В этом плане ПЦР ДНК позволяет проводить точную и быструю ПЦР-диагностику трихофитии (*Trichophyton rubrum*, *Tr. Mentagrophytes*, *Tr. Floccosum* и других видов трихофитии), а также кандидоза и аспергиллеза. По нашим данным, ДНК-диагностика патогенных грибов в образцах кожи или ногтей пластинок проводится в течение 1–2 суток после получения клинического материала. Все вышесказанное подчеркивает значимость молекулярно-биологических способов диагностики ониомикозов.

### 5.9. Стоматология

Некоторые из 600 видов микроорганизмов, населяющих полость рта, играют важную роль в развитии воспалительных заболеваний зубов и десен. Так, в старших возрастных группах (более 30 лет) наличие анаэробных бактерий в поддесневой области является признаком развития пародонтита. ПЦР-диагностика этих микробов начинает применяться, главным образом, для обоснования антимикробной терапии. В связи с этим нами проводилось изучение частоты выявления микроорганизмов — маркеров заболеваний кариеса и пародонта в различных возрастных группах российской популяции [12]. Выявление ДНК *Actinobacillus actinomycescomitans* (AA), *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Bacteroides forsythus* (BF) осуществляли в стандартных образцах биоматериала из ротовой полости. Всего обследованы 1985 человек в 4 городах России (Санкт-Петербург, Екатеринбург, Нижний Новгород и Новосибирск) в пяти возрастных группах (6, 12, 15, 35, 65 лет и старше) по 100 человек в каждой. Оба пола были одинаково представлены в подгруппах. Пробы

забирали с поверхности языка, наддесневого зубного налета и поддесневого зубного налета. Геноспецифическую ПЦР ДНК пародонтогенных бактерий проводили по мультиплексной методике. Как в общей выборке, так и в пределах отдельных регионов выяснилось, что **частота выявления микрофлоры оказалась наиболее высокой в пробах наддесневого зубного налета и составила:** для AA — 46,70%, для PG — 53,75%, для BF — 40,50%. Отмечена четкая возрастная динамика выявления микроорганизмов в полости рта, начиная с группы 6–7 лет. Максимум выявления AA, BF и PG отмечался в старших возрастах. Полученные нами данные показывают достаточно высокую чувствительность использованных нами методов ПЦР-диагностики изученных микроорганизмов, что дает возможность оценивать тяжесть пародонтитов и эффективность проводимого лечения.

### 5.10. ВИЧ-1 и СПИД

Различные аспекты диагностики ВИЧ-инфекции очень подробно освещались в литературе. Здесь следует лишь упомянуть о том, что первичная диагностика ВИЧ-1 проводится в образцах плазмы и сыворотки крови с помощью стандартных сертифицированных наборов для серологической диагностики, основанных на детекции специфических ВИЧ-антигенов и противовирусных антител.

Другой важной проблемой является определение динамики патологического процесса у ВИЧ-инфицированных лиц, в частности — числа вирусных частиц в крови (так называемой «вирусной нагрузки»). Этот показатель определяется методами количественной ПЦР. Как и при количественном определении гепатита С, проводится выделение вирусной РНК, ее обратная транскрипция с получением комплементарной ДНК (кДНК). Количество вируса в образце вычисляют по содержанию этой кДНК в реакционном объеме.

Кроме того, в свое время представляла интерес генодиагностика основных географических разновидностей (клейдов) ВИЧ-1, которая применяется на Западе уже более 10 лет, главным образом для изучения путей распространения и других эпидемиологических аспектов СПИДа. Однако выявление того или иного клейда ВИЧ-1 не связано непосредственно с прогнозом течения и программой лечения заболевания.

Намного большее значение имеет анализ генов лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1). Известны десятки мутаций генов протеазы и ревертазы ВИЧ-1, приводящие к развитию его резистентности к терапии соответствующими препаратами-ингибиторами. Это поколение лекарств составляет основу современной антиретровирусной терапии, существенно отодвигая сроки развития СПИДа и облегчая его течение. В обзоре М. Р. Бобковой [3] детально описываются методы диагностики этого класса мутаций ВИЧ-1, в том числе основные характеристики

гибридизационных тестов (наборы InnoLiPA со специфическими зондами, иммобилизованными на полосках, новые методы гибридизации на биочипах), а также методы прямого секвенирования (анализа последовательности нуклеотидов). И те, и другие виды диагностики, в особенности, секвенирование вирусных генов, существенно дороже «обычной» ПЦР, но данное исследование целесообразно проводить до начала дорогостоящего лечения соответствующими препаратами-ингибиторами.

#### Литература

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности» (Введение в предиктивную медицину). СПб., 2000.
2. Бобкова М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ и лабораторные методы ее определения // Клини. лабор. диагн. 2002; 1: 25–32.
3. Бобкова М.Р. Проблемы применения ПЦР для обеспечения инфекционной безопасности донорской крови // Клини. лабор. диагн. 2003; 7: 25–32.
4. Вавилова Т.В. Анти тромботическая терапия и методы ее лабораторного контроля // Клини. лабор. диагн. 2004; 12: 21–32.
5. Дмитриев А.В., Кантимова М., Микула И., Толоян А.А. Факторы и генетика патогенности стрептококков группы В // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунол. 2000; 5: 92–97.
6. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Роль ДНК-диагностики в современной онкологии // Вестн. РАМН. 2003; 10: 3–8, 9.
7. Киселев Ф.Л., Мазуренко Н.Н., Волгарева Г.М., Киселева Н.П. Взаимодействие вирусных и клеточных генов в опухолях шейки матки // Мол. биол. 2004; 38 (2): 224–232.
8. Колчинский А.М., Грядунов Д.А., Лысов Ю.П. и др. Микрочипы на основе трехмерных ячеек геля: история и перспективы // Мол. биол. 2004; 38 (7): 5–16.
9. Радченко В.Г., Стельмах В.В., Козлов В.К. Оптимизация этиопатогенетической терапии хронического гепатита С. СПб.: МАПО, 2004: 168.
10. Сафронникова Н.Р., Зарайский М.И., Чухловин А.Б. Факторы онкологического риска при папилломатозной инфекции // Вопр. онкол. 2003; 49 (4): 450–454.
11. Сенчук А.Я., Дубоссарская З.М. Перинатальные инфекции. М.: Медицинское информационное агентство, 2005: 318.
12. Соловьева А.М., Матело С.К., Толоян А.А. и соавт. Эпидемиологические исследования распространенности периодонтопатогенной микрофлоры полости рта у населения России // Стоματοлогия. 2005; 84 (5): 14–20.
13. Чухловин А.Б., Забелина Т.С., Зубаровская Л.С. и соавт. Связь промоторного полиморфизма гена коллагеназы-1 с развитием острой реакции «трансплантат против хозяина» при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток // Мед. иммунол. 2003; 5 (1–2): 101–106.
14. Чухловин А.Б., Толоян Арег А. Генодиагностика возбудителей инфекционных заболеваний и поиск специфических «генов риска» // Клини. лабор. диагн. 2005; 4.
15. Goldfarb D.S. Microorganisms and calcium oxalate stone disease // Nephron Physiol. 2004; 98 (2): 48–54.
16. Goodman M.T., McDuffie K., Hernandez B. et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and dietary folate with the risk of cervical dysplasia // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2001; 10 (12): 1275–1280.
17. Lane D.A., Grant P.G. Role of hemostatic gene polymorphism in venous and arterial thrombotic disease // Blood. 2000; 95: 1517–1532.
18. Mangia A., Santoro R., Piattelli M. et al. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection // Cytokine. 2004; 25 (3): 103–109.
19. Soriano F., Tauch A. Microbiological and clinical features of *Corynebacterium urealyticum*: urinary tract stones and genomics as the Rosetta Stone // Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14 (7): 632–643.
20. Stickler D.J., Morgan S.D. Observations on the development of the crystalline bacterial biofilms that encrust and block Foley catheters // J. Hosp. Infect. 2008; 69 (4): 350–360.

## ОЦЕНКА ГАЗОВОГО ОБМЕНА У ПАЦИЕНТОВ С ОТКРЫТЫМИ ПЕРЕЛОМАМИ КОСТЕЙ ГОЛЕНИ И БЕДРА В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ ИХ ПО МЕТОДУ ИЛИЗАРОВА

М.В. СТОГОВ, Т.И. ДОЛГАНОВА, И.И. МАРТЕЛЬ

ФГБУ «Российский научный центр “Восстановительная травматология и ортопедия” им. акад. Г.А. Илизарова» МЗ РФ, Курган

**Резюме.** В представленном исследовании изучали парциальное давление кислорода и углекислого газа в тканях травмированной и интактной конечностей у пациентов с открытыми переломами костей нижней конечности в динамике лечения по методу Илизарова. В сыворотке крови изучали показатели энергетического обмена. Обнаружено, что в посттравматический период скорость восстановления энергетического обмена в тканях поврежденного сегмента конечности напрямую не зависит от скорости восстановления их газового режима.

**Ключевые слова:** открытая травма, газовый обмен, аппарат Илизарова.

## OPEN FRACTURES OF THE TIBIA AND FEMUR TREATED BY THE ILIZAROV METHOD

M.V. STOGOV, T.I. DOLGANOVA, I.I. MARTEL

Federal State Budgetary Institution “Russian Research Center “Restorative Traumatology And Orthopedics” Named After G.A. Ilizarov”, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kurgan

**Summary.** During the current study dynamics of partial pressure of oxygen and carbon dioxide in tissues of the injured and intact limb was investigated in patients with open fractures of the lower limbs who were treated by Ilizarov method. Parameters of energy turnover in the blood serum were examined. We found that restoration rate of energy turnover in tissues of the injured limb segment did not directly depend on restoration rate of their gaseous exchange regime.

**Key words:** open fracture, gaseous exchange, Ilizarov apparatus.

### Данные для корреспонденции

Стогов Максим Валерьевич, д. б. н., ведущий научный сотрудник КЭЛО ФГБУ

«Российский научный центр “Восстановительная травматология и ортопедия” им. акад. Г.А. Илизарова» МЗ РФ

E-mail: stogo\_off@list.ru.

### Введение

Газовый режим тканей организма является одним из главных факторов, определяющих их функциональное состояние. По данным литературы, при травматических повреждениях конечностей в мягких тканях имеет место та или иная степень гипоксии [6, 8]. При оценке репаративных процессов заживления тканей травмированной конечности показатель насыщения кислородом тканей не отражает интенсивность его использования клетками [9]. Так, если у больных с хронической артериальной недостаточностью конечности значения парциального давления кислорода в тканях менее 10 мм рт. ст. соответствуют тяжелой степени хронической ишемии с неблагоприятным прогнозом [10], то в условиях острой посттравматической ишемии, по нашим данным, исход лечения может быть благоприятным даже при ну-

левых значениях  $pO_2$ , наблюдаемых в течение 3–5 дней, и при регистрируемом  $pCO_2$ , близком к норме [4].

### Цель исследования

Изучить состояние энергетического обмена и газового режима тканей конечностей у пациентов с открытыми переломами костей нижней конечности в процессе лечения их по методу Илизарова.

### Материал и методы

Проведено обследование 94 пациентов с открытыми переломами костей голени и бедра в процессе лечения методом чрескостного остеосинтеза по Илизарову. Средний возраст больных составил  $38,5 \pm 4,7$  года. Критери-

ем распределения больных по тяжести травматизации стала классификация А. В. Каплана, О.Н. Марковой (1967). В соответствии с ней было выделено четыре группы больных, каждая из которых включала следующие типы переломов: первая (40 человек) – с переломами IA, Б, В; вторая (55 человек) – с переломами IIА, Б, В и IIIА; третья (52 человека) – IVБ, В и четвертая (20 человек) – IV тип.

Для исследования газового режима тканей использовали чрескожный мониторинг напряжения кислорода и углекислого газа Model 840 (VFD, США), согревающий датчик ( $t = 44\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) с модифицированным электродом типа «Clark» для длительного определения  $pO_2$ ,  $pCO_2$ . Накожный согревающий датчик с помощью адгезивных колец крепился на обезжиренную кожу тыла стопы поврежденной и интактной конечностей. Исследования транскутанного напряжения газов проводили у пациентов с интервалом 1–5 дней первые две недели лечения и с интервалом 15–20 дней до снятия аппарата Илизарова.

Параллельно проводили общий и биохимический анализ крови. В сыворотке крови определяли концентрацию продуктов гликолиза – молочной и пировиноградной кислот, а также уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгат (ДК) и малонового диальдегида (МДА). Содержание лактата в сыворотке крови определяли на биохимическом фотометре Stat Fax® 1904+ (США) с использованием наборов реагентов фирмы Vital Diagnostic (Россия). Концентрацию пирувата определяли по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином, уровень МДА – по реакции с тиобарбитуровой кислотой, ДК определяли после экстракции гептанизопропаноловой смесью (1:1) в гептановой фракции при длине волны 232 нм, концентрацию про-

дуктов ПОЛ рассчитывали по уровню общих липидов, которые определяли с помощью наборов фирмы «Lachema» (Чехия).

Исучаемые в динамике лечения показатели сравнивали с референтными величинами, в качестве которых использовали данные 35 практически здоровых людей в возрасте 20–45 лет. Для выявления значимости различий использовали непараметрический W-критерий Вилкоксона.

### Результаты и обсуждение

В зависимости от тяжести повреждения, показатели тканевого газового обмена распределялись в следующем соответствии (табл. 1): у пациентов 1–3-й групп в первые две недели после операции на больной конечности регистрировалась умеренная гипоксия тканей ( $pO_2$  относительно значений нормы было снижено на 10–20%) в сочетании с гиперкапнией ( $pCO_2$  относительно нормы было увеличено на 20–40%). На интактной конечности – выражена гиперкапния тканей:  $pCO_2$  увеличено на 80–100%. У пациентов 4-й группы на пораженной конечности наблюдалась значительная гипоксия тканей в сочетании с гиперкапнией; на интактной – достоверных отклонений от нормы в показателях парциального давления кислорода не выявлено, значения  $pCO_2$  на 20% превышали значения нормы.

Через месяц лечения у пациентов всех групп значения парциального напряжения кислорода в тканях увеличивались. При сохранении целостности магистрального артериального русла (1–3 группы) значения  $pO_2$  превышали норму на 16–27%, наиболее выраженная гипероксия была у пациентов 1-й группы – с наименьшим повреждением мягких тканей. У пациентов 4-й группы также отмечался прирост значений  $pO_2$ , но, тем не менее, гипоксия тканей сохранялась.

**Таблица 1. Парциальное давление кислорода и углекислого газа (мм рт. ст.) в тканях поврежденной и интактной конечностей у пациентов с открытым переломом костей нижней конечности (n – число наблюдений,  $M \pm m$ )**

	группы больных			
	1	2	3	4
1–14 суток после операции	n = 31	n = 30	n = 28	n = 34
$pO_2$ (больная конечность)	$44,1 \pm 2,6^*$	$48,9 \pm 2,5^*$	$45,5 \pm 3,8^*$	$19,5 \pm 3,6^*$
$pCO_2$ (больная конечность)	$60,1 \pm 2,1^*$	$59,1 \pm 2,6^*$	$54,8 \pm 5,4^*$	$78,7 \pm 6,9^*$
$pO_2$ (интактная конечность)	$62,4 \pm 4,9^*$	$52,4 \pm 3,0$	$56,3 \pm 2,8$	$55,6 \pm 1,8$
$pCO_2$ (интактная конечность)	$88,4 \pm 6,3^*$	$83,8 \pm 4,7^*$	$80,7 \pm 4,9^*$	$53,0 \pm 3,0^*$
1–2 месяца после операции	n = 23	n = 113	n = 43	n = 23
$pO_2$ (больная конечность)	$69,0 \pm 2,5^*$	$66,6 \pm 1,5^*$	$63,2 \pm 2,2^*$	$37,1 \pm 3,2^*$
$pCO_2$ (больная конечность)	$76,6 \pm 5,9^*$	$72,1 \pm 2,0^*$	$65,0 \pm 2,4^*$	$61,3 \pm 2,2^*$
$pO_2$ (интактная конечность)	$70,0 \pm 1,9^*$	$49,9 \pm 2,7^*$	$51,9 \pm 4,5$	$53,4 \pm 3,2$
$pCO_2$ (интактная конечность)	$87,1 \pm 6,2^*$	$61,9 \pm 3,2^*$	$65,6 \pm 4,6^*$	$54,6 \pm 3,0^*$

Норма [7]:  $pO_2 = 54,0 \pm 1,0$ ;  $pCO_2 = 43,0 \pm 1,0$ .

\* – достоверные различия с нормой при  $p < 0,05$ .

Клинически наибольшее значение имеют показатели постишемической функциональной пробы (рис. 1, 2), которые позволяют диагностировать критическую и субкритическую ишемию нижних конечностей [5], определять функциональный резерв микроциркуляции [2].

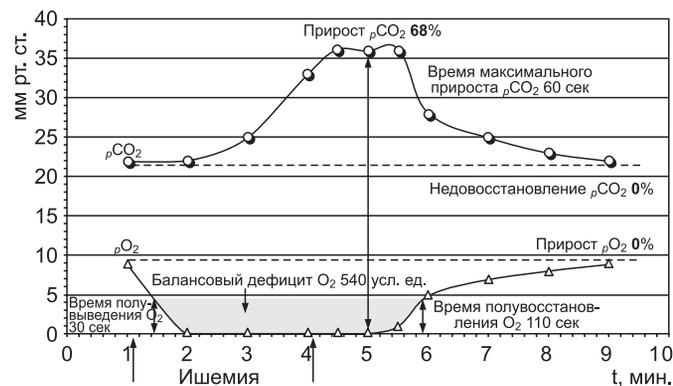


Рис. 1. Кривые динамики парциального давления кислорода и углекислого газа ( $pO_2$  и  $pCO_2$ ) при функциональной ишемической пробе у больного П., 26 лет. DS: открытый перелом костей голени IV типа через 10 дней после остеосинтеза по Илизарову

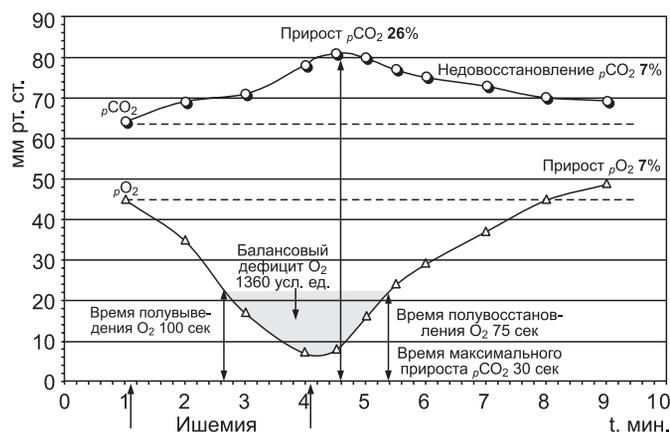


Рис. 2. Кривые динамики парциального давления кислорода и углекислого газа ( $pO_2$  и  $pCO_2$ ) при функциональной ишемической пробе у больного К., 35 лет. DS: открытый перелом костей голени IB типа через 3 дня после остеосинтеза по Илизарову

В таблице 2 представлены основные показатели кривых динамики  $pCO_2$  и  $pO_2$  после трехминутной ишемической пробы больной конечности у пациентов первой (минимальное травматическое повреждение тканей с сохраненным магистральным кровотоком) и четвертой групп (травматическое повреждение тканей с повреждением магистральных артерий).

У пациентов 1-й группы в первые две недели после операции было увеличено время полувыведения кислорода, время полувосстановления кислорода достоверно не отличалось от значений нормы [3]. По сравнению с нормой уменьшалось и время максимального прироста  $pCO_2$ , его прирост после ишемической пробы составлял 20–30%, а через 10 мин после окончания ишемии имело место недовосстановление  $pCO_2$  на 7–10%. Уровень восстановления  $pO_2$  через 10 минут после окончания ишемической пробы превышал исходный на 5–10%, что указывало на сохранение резервных возможностей сосудистого русла оперированного сегмента. Расчетный показатель «балансовый дефицит кислорода» был снижен. Через 1 месяц после операции в процессе ишемической пробы медленнее происходило исчерпание запаса кислорода в тканях, время полувыведения  $pO_2$  увеличивалось на 20–30%, а время полувосстановления  $pO_2$  уменьшалось в 1,5 раза. Расчетный показатель «балансовый дефицит кислорода» относительно срока в две недели не менялся.

У пациентов 4-й группы уменьшалось относительно нормы время полувыведения  $pO_2$ , а время полувосстановления  $pO_2$  увеличивалось на 30–40%. Регистрировалось полное исчерпание кислорода через 50–60 с ишемической пробы. Восстановление  $pO_2$  и  $pCO_2$  до исходного уровня происходило через 10 минут после окончания ишемической пробы, что указывало на отсутствие резервных возможностей сосудистого русла оперированного сегмента. Прирост  $pCO_2$  после ишемической пробы составлял в начале лечения 50,5% и сохранялся повышенным весь период лечения. Расчетный показатель «балансовый дефицит кислорода» был зна-

Таблица 2. Основные показатели трехминутной ишемической пробы кривых динамики парциального давления кислорода и углекислого газа у пациентов 1-й и 4-й групп (n — число наблюдений, M ± m)

Показатель	Норма	1 группа (n = 25)		4 группа (n = 10)	
		1–14 сут. после операции	1–2 мес. после операции	1–14 сут. после операции	1–2 мес. после операции
Время полувыведения $pO_2$ (с)	82,6 ± 4,6	100,0 ± 4,1*	125,0 ± 6,2*	30,0 ± 1,2*	30,0 ± 5,7*
Время полувосстановления $pO_2$ (с)	81,9 ± 4,1	80,0 ± 4,5	45,0 ± 4,2*	110,0 ± 5,7*	110,0 ± 5,1*
% прироста $pO_2$	5,0 ± 2,5	8,0 ± 2,5	7,5 ± 1,9	0 ± 0	0 ± 0
% недовосстановления $pCO_2$	0,5 ± 0,5	7,0 ± 1,5*	7,0 ± 2,3*	0 ± 0	0 ± 0
Время максимального прироста $pCO_2$ (с)	63,0 ± 2,6*	40,0 ± 2,1*	40,0 ± 2,6*	60,0 ± 2,2	62,0 ± 4,3
% прироста $pCO_2$	16,3 ± 3,9	26,3 ± 4,1*	10,0 ± 1,2	50,5 ± 7,2*	22,3 ± 6,1*
Балансовый дефицит $pO_2$ (у.е.)	2500 ± 200	1400 ± 120*	1400 ± 100*	890 ± 57*	2170 ± 150

Примечание: \* — достоверные различия с нормой при  $p < 0,05$ .

чительно снижен. Через месяц после операции у пациентов 4-й группы к окончанию ишемической пробы имело место полное исчерпание кислорода. Временные расчетные параметры кривых динамики  $pO_2$  и  $pCO_2$  относительно предыдущего срока не изменялись.

Развитию тканевой гипоксии у пациентов с открытыми переломами способствовало также снижение уровня гемоглобина в крови, минимальные значения которого у пациентов всех групп наблюдались на 3-е сутки после операции (табл. 3). При этом у пациентов 4-й группы низкие значения гемоглобина сохранялись в течение месяца после операции.

Развивающаяся тканевая гипоксия у пациентов с открытым переломом приводила к росту в сыворотке крови концентрации недоокисленных продуктов обмена, в большей степени лактата и в меньшей — пирувата (табл. 4). Максимальный уровень гиперлактатемии приходился на 14-е сутки после операции, когда средние значения  $pO_2$  тканей соответствовали уровню развития гипоксических изменений в мышцах

при травме, полученной в экспериментальных условиях [1].

В дальнейшем, несмотря на отмеченное снижение уровня гипоксии в тканях поврежденного сегмента конечности, концентрация лактата в сыворотке крови оставалась достоверно выше нормы не только через месяц лечения, но и к моменту снятия аппарата.

Такое наблюдение свидетельствовало о том, что в период с 14–30-х суток после операции, несмотря на рост  $pO_2$ , была снижена эффективность усвоения кислорода тканями. Одной из причин такого снижения может являться процесс интенсификации реакций перекисного окисления липидов, которое наблюдается в ишемизированных тканях при восстановлении в них кровотока. В пользу этого предположения — полученные нами данные, демонстрирующие увеличение в плазме крови концентрации продуктов ПОЛ — малонового диальдегида и диеновых конъюгат (табл. 5). Важно также отметить, что величина активации ПОЛ и выраженность лактатацидоза у пациентов не зависели от тяжести травмы.

**Таблица 3. Уровень гемоглобина (г/л) в крови пациентов с открытым переломом костей нижней конечности в динамике лечения (n – число наблюдений, M ± m)**

Группы больных	1 (n = 40)	2 (n = 55)	3 (n = 52)	4 (n = 20)
Норма	145 ± 16	145 ± 16	145 ± 16	145 ± 16
При поступлении	113 ± 19*	108 ± 24*	110 ± 23*	102 ± 25*
3-е сутки после операции	104 ± 14*	102 ± 8*	87 ± 13*	86 ± 16*
14-е сутки после операции	112 ± 6*	117 ± 6*	104 ± 11*	101 ± 15*
1 месяц после операции	124 ± 10	129 ± 9	126 ± 14	107 ± 18*
Конец фиксации	138 ± 5	124 ± 15	120 ± 17	118 ± 14

Примечание: \* — достоверные различия с нормой при  $p < 0,05$ .

**Таблица 4. Концентрация продуктов гликолиза в сыворотке крови пациентов с открытым переломом костей нижней конечности в динамике лечения (M ± m)**

	Лактат, ммоль/л	Пируват, мкмоль/л
Норма	1,80 ± 0,53	166 ± 31
При поступлении	2,30 ± 0,62*	175 ± 38
3-е сутки после операции	4,14 ± 0,71*	153 ± 49
14-е сутки после операции	6,04 ± 0,92*	170 ± 38
Месяц после операции	3,13 ± 0,60*	213 ± 35*
Конец фиксации	3,68 ± 0,88*	158 ± 20

Примечание: \* — достоверные различия с нормой при  $p < 0,05$ .

**Таблица 5. Концентрация продуктов ПОЛ в плазме крови пациентов с открытым переломом костей нижней конечности в динамике лечения (M ± m, n = 60)**

	ДК, нмоль/мг липидов	МДА, нмоль/мг липидов
Норма	2,31 ± 0,56	1,11 ± 0,18
14-е сутки после операции	5,87 ± 1,48*	1,52 ± 0,40*
1 месяц после операции	2,58 ± 0,64	1,42 ± 0,22*

Примечание: \* — достоверные различия с нормой при  $p < 0,05$ .

**Выводы.** Таким образом, проведенное нами исследование обнаружило, что у пациентов с открытыми переломами костей нижней конечности в посттравматический период в тканях травмированной конечности развивалась гипоксия, выраженность которой зависела от тяжести разрушения тканей. В ходе лечения происходило восстановление газового режима тканей поврежденной конечности. На этом фоне восстановление метаболического профиля, свидетельствовавшего об активации реакций энергообмена аэробной направленности, было более пролонгированным, что говорило о недостаточной эффективности использования тканей кислорода.

#### Литература

1. Баранов В.И., Новосельцев С.В. Методика регистрации зависимости потребления  $O_2$  скелетной мышцей крысы от напряжения  $O_2$  в инкубационном растворе // Росс. физиол. журн. 2002; 1: 113–116.
2. Гуч А.А., Клименко И.Т., Влайков Г.Г., Шувалова И.Н. Изменения регионарной гемодинамики и микроциркуляции в тканях нижних конечностях у больных с облитерирующим атеросклерозом в I-II стадиях // Клін. хірургія. 2003; 6: 25–27.
3. Долганова Т.И. Диагностическая значимость ишемической пробы в оценке газового состава тканей при их травматическом или врожденном поражении // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2005; 4: 32–37.

4. Долганова Т.И., Мартель И.И., Долганов Д.В. Оценка микроциркуляции и газового метаболизма тканей у больных с открытыми переломами костей голени в процессе лечения аппаратом Илизарова // Материалы научно-практ. конф. «Методы исследования регионарного кровообращения и микроциркуляции в клинике». СПб., 2004: 125–127.

5. Кротовский Г.С., Зудин А.М., Учкин И.Г. Дифференциальная диагностика критической и субкритической стадий ишемии нижних конечностей путем изучения параметров микроциркуляции методом лазерной доплерфлоуметрии на фоне нереконструируемого хронического окклюзионного заболеваний артерий // Груд. и серд.-сосуд. хирургия. 2000; 3: 48–53.

6. Фишкин В.И., Львов С.Е., Удальцов В.Е. Регионарная гемодинамика при переломах костей. М.: Медицина, 1981: 184.

7. Шевцов В.И., Щурова Е.Н., Щуров В.А. Чрескожное определение напряжения кислорода и углекислого газа у больных с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей // Вестник хирургии. 1999; 3: 30–33.

8. Щурова Е.Н., Долганова Т.И., Лунова С.Н. Оценка газового режима поврежденных тканей // Патол. физиол. и экспериментальная медицина. 2004; 1: 22–24.

9. Wipke-Tevis D.D., Stotts N.A. Nutrition, tissue oxygenation, and healing of venous leg ulcers // J. Vasc. Nurs. 1998; 16 (3): 48–56.

10. Wütschert R., Bongard O., Bounameaux H. Utilité clinique de la mesure transcutanée de la pressiol partielle d'oxygène // STV: Sang. thrombose, vaisseaux. 1998; 10 (9): 581–585.

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

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ГОМЕОСТАЗА У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ КОСТЕЙ ГОЛЕНИ

С.Н. ЛУНЕВА, Т.И. ДОЛГАНОВА, Н.М. КЛЮШИН  
ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» МЗ РФ

**Резюме.** Изучали показатели периферической гемодинамики у больных с хроническим остеомиелитом в зависимости от степени эндогенной интоксикации в процессе лечения методом чрескостного остеосинтеза. Установили, что при хроническом посттравматическом остеомиелите голени развивается синдром эндогенной интоксикации, проявляющийся, в частности, увеличением концентрации веществ средней и низкой молекулярной массы в плазме (ВНСММп). До лечения увеличение концентрации ВНСММп более 13,232 усл. ед. вызывает повышение периферического тонуса сосудов, гипотонус вен с замедлением скорости венозного оттока и увеличение кровенаполнения тканей пораженного сегмента. На этапах лечения с помощью аппарата Илизарова повышение концентрации ВНСММп не вызывает значимых нарушений гемодинамики.

**Ключевые слова:** хронический остеомиелит, эндогенная интоксикация, чрескостный остеосинтез, вещества средней и низкой молекулярной массы.

## METABOLIC CRITERIA FOR EVALUATING HOMEOSTASIS IN PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS OF THE LOWER LEG BONES

S.N. LUNEVA, T.I. DOLGANOVA, N.M. KLJUSHIN

Federal State Budgetary Institution "Russian Research Center "Restorative Traumatology And Orthopedics" Named After G.A. Ilizarov", Ministry of Healthcare of the Russian Federation

**Summary.** Peripheral hemodynamics depending on intensity of endogenous intoxication was studied in patients with chronic osteomyelitis of the lower leg bones who were treated by using a transosseous osteosynthesis technique. We found that chronic posttraumatic osteomyelitis of the lower leg bones results in development of syndrome of endogenous intoxication particularly manifested by increased concentration of the average and lower molecular weight compounds in the blood sera (ALMWCS). Before treatment concentration of the ALMWCS was increased up to 13.232 arbitrary units that gave rise to elevated peripheral vascular tone, venous hypotonia with a delayed velocity of the venous return and enhanced blood filling of tissues within the injured segment. While Ilizarov apparatus was applied we saw no significant hemodynamic disturbances due to an increased concentration of ALMWCS.

**Key words:** chronic osteomyelitis, endogenous intoxication, transosseous osteosynthesis, average and lower molecular weight compounds.

### Данные для корреспонденции

Лунева Светлана Николаевна, проф., д. б. н., руководитель клинико-экспериментального лабораторного отдела ФГУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» МЗ РФ 640014, Курган, ул. М. Ульяновой, 6, тел. (3522) 45-05-38, факс (3522) 45-40-60  
e-mail: S\_Luneva@mail.ru, office@ilizarov.ru

### Введение

Известно, что гнойный процесс при посттравматическом остеомиелите обусловлен нарушениями макро- и микроциркуляции в мягких тканях и в очаге поражения костной ткани с развитием некроза [14]. Обширность поражения костей некротическим процессом находится в прямой зависимости от характера и глубины повреждения внутрикостного сосудистого русла [10]. Нарушение кровоснабжения пораженного сегмента, наблюдаемое при остеомиелите, развивается за счет окклюзий в артериальной и венозной системе [1, 12], компенсатор-

ного артериовенозного шунтирования [4], постоперационного отека, длительной реакции вазоконстрикции периферических сосудов [3] и других факторов. За счет этого ухудшаются трофика окружающих тканей и течение основного заболевания [10], что, в свою очередь, вызывает нарушение циркуляции крови. Нарушается баланс между интенсивностью окислительных процессов и возможностями антиоксидантной защиты [15]. Возникает дисбаланс между центральными и периферическими звеньями регуляции вегетативных систем,

регистрируется неадекватная реакция сосудистого русла на традиционные фармакологические схемы лечения [16]. С другой стороны, адекватный уровень регионарного кровотока — одно из условий формирования костного регенерата и перестройки костной модели в процессе лечения методами чрескостного остеосинтеза [5, 11].

Считается, что течение любого соматического, хирургического, инфекционного заболевания сопровождается развитием синдрома эндогенной интоксикации (ЭИ), обусловленным накоплением в тканях и биологических жидкостях организма продуктов патологического обмена веществ, деструкции тканевых структур [6, 8]. Все эндогенные токсические субстраты нарушают регуляцию процессов микроциркуляции и системы агрегатного состояния крови. В результате развившихся нарушений усиливаются метаболические изменения и гипоксия тканей [2]. Тем не менее, в доступной литературе мы не нашли публикаций, посвященных взаимосвязи ЭИ и регионарной гемодинамики при хроническом остеомиелите.

Целью данной работы явилась оценка показателей периферической гемодинамики у больных с хроническим остеомиелитом в зависимости от разной степени эндогенной интоксикации.

#### Материал и методы исследования

Обследовано 17 больных с хроническим посттравматическим остеомиелитом костей голени (свищевая форма) в процессе лечения аппаратом Илизарова с интервалом между обследованиями 2 недели. Все больные — мужчины в возрасте от 17 до 45 лет, с длительностью заболевания от 6 месяцев до 7 лет. При поступлении в клинику Центра у всех больных была диагностирована стадия обострения процесса. Всем больным выполнены разработанные в РНЦ «ВТО» методики чрескостного остеосинтеза аппаратом Илизарова. С учетом этапа лечения были выделены следующие группы: 1) до оперативного лечения (исходная) — 15 обследований; 2) в процессе лечения аппаратом Илизарова — 62 обследования.

Метаболические критерии гомеостаза оценивались по степени выраженности эндогенной интоксикации и показателям периферической гемодинамики.

Оценка результатов исследования периферической гемодинамики проводилась по данным реовазографии (РВГ) пораженной голени, выполненной на универсальном мониторингном комплексе УНИМОК 01–03 РЕО «РЕОАНАЛИЗАТОР РИД-114Д» (С.-Петербург). Были проанализированы следующие показатели компьютерной обработки реограмм [13]:

##### 1. Артериальная компонента:

- регионарный минутный объемный пульс (РМОП, мл/мин × 100 см<sup>3</sup> ткани) — количество крови, поступающее в 100 см<sup>3</sup> ткани за 1 минуту;
- амплитуда реографической волны (АРГ, Ом).

##### 2. Венозная компонента:

- амплитуда венозной компоненты (ВК, Ом);
- систоло-диастолический показатель (СДП, отн. ед.), отражающий отношение венозной и артериальной компонент;
- соотношение длительности анакроты и катакроты ( $\alpha/\beta$ , отн. ед.);
- показатель венозного оттока (ВО, %), отражающий тонус венозного русла исследуемой области.

##### 3. Тонус периферических сосудов:

- венозно-артериальный показатель (В/А, %) — отражающий преимущественно величину сосудистого сопротивления, определяемого тонусом мелких сосудов (артериол, капилляров, венул) исследуемой области;
- индекс периферического сопротивления (ИПС, %), отражающий периферическое сосудистое сопротивление;
- показатель модуля упругости сосудов (ПМУ, %), отражающий эластико-тонические свойства крупных артериальных сосудов;
- дикротический индекс (ДКИа, %) — показатель, отражающий преимущественно состояние прекапиллярных мелких сосудов (артериол);
- диастолический индекс (ДСИ, %) — показатель, отражающий преимущественно состояние посткапиллярных мелких сосудов (венул и вен).

Уровень интоксикации устанавливали по методу М.Я. Малаховой [9]. Определяли содержание веществ низкой и средней молекулярной массы в плазме (ВНСМ-Мп), так как именно эта группа веществ является основным биохимическим субстратом ЭИ [7].

Контрольная группа для определения показателей ЭИ состояла из 18 здоровых человек в возрасте 19–22 года. Контрольная группа для определения показателей РВГ состояла из показателей РВГ интактной конечности 270 человек в возрасте от 17 до 60 лет с невоспалительными ортопедическими заболеваниями на доклиническом этапе.

Статистическая обработка материала проводилась с использованием программы Excel. Определяли средние значения исследуемых параметров, среднюю ошибку. Достоверность различий между группами проверяли с помощью W-критерия Вилкоксона. Для определения связи показателей регионарной гемодинамики с уровнем ЭИ рассчитывали коэффициенты корреляции с использованием метода главных компонент.

#### Результаты и их обсуждение

В зависимости от содержания ВНСММп в каждой из двух групп больных были выделены подгруппы с разной степенью интоксикации:

- а) норма (концентрация ВНСММп менее 11,730 усл. ед.);
- б) субнорма (концентрация ВНСММп 11,730–13,232 усл. ед.);

в) патология (концентрация ВНСММп более 13,232 усл. ед.).

Оценивали показатели регионарной гемодинамики в каждой из указанных подгрупп. Результаты представлены в таблице 1.

По данным реовазографии до лечения у больных при визуальном анализе регистрировались реографические волны с замедленным изменением импеданса, резко сниженными значениями АРГ, вершина реовазограммы приобретала форму «плато» с высоким положением инцизуры и дикротическим зубцом. При анализе расчетных показателей реовазограммы были выявлены достоверные изменения части расчетных показателей у пациентов 3-й группы. При сниженных значениях амплитуды реоволны было зарегистрировано увеличение на 55% РМОП, что обусловлено снижением базисного сопротивления тканей, величина которого входит в знаменатель формулы расчета РМОП. Уменьшение импеданса тканей могло появиться вследствие изолированного увеличения объема циркулирующей крови в исследуемом участке, застойного или воспалительного отека тканей, лимфостаза, тромбофлебита. Венозно-артериальный показатель был увеличен в среднем на 25%, что позволяет говорить о наличии вазоконстрикции мелких сосудов, преимущественно капилляров. Также мы регистрировали увеличение дикротического и диастолического индексов на 65% и 27% соответственно, отражающее повышение тонуса прекапиллярных и посткапиллярных сосудов. Расчетные показатели индекса периферического сопротивления и коэффициента эластичности сосудов также свидетельствовали о снижении эластичности крупных сосудов и повышении тонуса сосудов мелкого калибра. Повышение периферического

сопротивления сосудов при увеличении расчетных показателей объема циркулирующей крови в исследуемом сегменте было расценено как признак артерио-венозного шунтирования. Показатель венозного оттока в 9 раз превышал нормальные значения, и в сочетании с данными амплитуды венозной компоненты и отношения анакроты и катакроты интерпретировался как затруднение оттока крови из вен крупного и среднего калибра по гипотоническому типу.

На этапе лечения во всех подгруппах отмечалось снижение амплитудных показателей артериальной и венозной компонент, что обусловлено уменьшением базисного сопротивления тканей в условиях лечения аппаратом Илизарова. Расчетный показатель РМОП, учитывающий экстраполированную амплитуду артериальной компоненты реографической волны и сопротивление тканей, достоверно не отличался от значений нормы. Во всех трех группах отмечалось снижение тонуса артерий и вен, уменьшение расчетного показателя периферического сопротивления сосудов. В 3-й группе сохранялось увеличение длительности катакроты, что свидетельствует о затрудненном венозном оттоке.

Учитывая, что при синдроме ЭИ на показатели периферической гемодинамики могут оказывать влияние и другие токсические субстанции, кроме ВНСММп, определяли коэффициенты корреляции между концентрацией последних и величинами показателей РВГ. Результаты представлены в таблице 2.

До лечения определялась положительная корреляционная связь между уровнем ВНСММп и показателями АРГ, ВК, В/А,  $\alpha/\beta$  и РМОП и отрицательная — с величиной СДП. При комплексном анализе полученных данных было сделано заключение, что на фоне повыше-

**Таблица 1. Показатели периферической гемодинамики на этапах лечения при разной концентрации ВНСММп**

Показатели	Норма	До лечения			В процессе лечения		
		1	2	3	1	2	3
РМОП	8,4 ± 0,58	6,2 ± 1,16	7,5 ± 0,99	13,1 ± 1,45*	6,1 ± 0,55	5,9 ± 0,39	6,1 ± 0,46
АРГ	0,10 ± 0,0030	0,008 ± 0,0007*	0,018 ± 0,0022*	0,022 ± 0,0415*	0,013 ± 0,0015*	0,011 ± 0,0013*	0,011 ± 0,0031*
ВК	0,077 ± 0,0012	0,007 ± 0,0036*	0,0016 ± 0,0043*	0,0021 ± 0,0073*	0,006 ± 0,00063*	0,006 ± 0,00060*	0,006 ± 0,00062*
$\alpha/\beta$	1 : 5 ± 0,50	1 : 5,8 ± 0,52	1 : 6,1 ± 0,32	1 : 7,75 ± 0,46*	1 : 6,4 ± 0,48	1 : 6,2 ± 0,22	1 : 7,0 ± 0,27*
СДП	3,5 ± 0,30	2,9 ± 0,21	1,9 ± 0,05*	1,5 ± 0,19*	2,5 ± 0,20*	2,0 ± 0,11*	2,1 ± 0,12*
ВО	2,6 ± 2,25	12,9 ± 5,8*	18,7 ± 4,2*	25,9 ± 6,1*	1,02 ± 4,94	1,89 ± 6,11	9,87 ± 5,23
В/А	73,4 ± 12,41	62,6 ± 16,26	70,6 ± 8,63	91,7 ± 6,27*	51,5 ± 3,0*	58,7 ± 3,45*	57,6 ± 2,48*
ПМУ	15,1 ± 0,19	15,9 ± 0,81*	15,8 ± 1,35	12,7 ± 0,53*	14,3 ± 0,71	12,5 ± 0,52*	12,8 ± 0,42*
ДКИа	35,3 ± 5,32	46,7 ± 5,65*	51,1 ± 3,83*	58,5 ± 8,64*	39,3 ± 8,18	43,5 ± 5,95	42,7 ± 5,35
ДСИа	51,3 ± 5,98	53,0 ± 7,17	61,5 ± 2,06*	65,2 ± 5,15*	42,2 ± 6,02	54,7 ± 3,70	53,9 ± 2,60
ИПС	53,7 ± 12,59	84,6 ± 17,61	110,5 ± 9,29*	108,4 ± 36,35*	67,0 ± 14,99	68,6 ± 9,61	76,2 ± 11,12

Примечание: \* показана достоверность  $p < 0,05$  отличия показателей от значений нормы.

**Таблица 2. Коэффициенты корреляции между концентрацией ВНСММп и показателями РВГ на разных этапах лечения**

Показатели РВГ	Этапы	
	До лечения	Во время лечения
АРГ	<b>0,62</b>	-0,10
ВК	<b>0,53</b>	0,03
В/А	<b>0,60</b>	0,09
ИПС	0,20	0,09
ПМУ	0,19	-0,04
СДП	<b>-0,41</b>	-0,19
ВО	0,40	0,22
$\alpha/\beta$	0,40	0,08
ДКИа	0,12	0,03
ДСИа	0,18	0,21
РМОП	<b>0,73</b>	-0,01

ного уровня ВНСММп регистрируется показатели, отражающие наличие артерио-венозного шунтирования, спазма мелких периферических сосудов, затрудненного венозного оттока по гипотоническому типу. Изменения других показателей РВГ были связаны, по-видимому, с воздействием иных факторов. На этапе лечения влияния уровня ВНСММп на показатели периферической гемодинамики выявлено не было. Это можно связать со снижением роли данной токсической субстанции в нарушении местного кровообращения после санации гнойного очага и увеличением влияния на эти процессы других нейрогуморальных факторов, связанных с наличием аппарата внешней фиксации.

### Выводы

1. При хроническом посттравматическом остеомиелите голени развивается синдром ЭИ, проявляющийся, в частности, увеличением концентрации ВНСММп.

2. До лечения увеличение концентрации ВНСММп более 13,232 усл. ед. вызывает повышение периферического тонуса сосудов, гипотонус вен с замедлением скорости венозного оттока и увеличение кровенаполнения тканей пораженного сегмента.

3. На этапе лечения больных с посттравматическим остеомиелитом костей голени с помощью аппарата Илизарова повышение концентрации ВНСММп не вызывает значимых нарушений периферической гемодинамики.

### Литература

1. *Беляева А.А., Махсон Н.Е., Савадян Э.Ш.* Лечение хронического посттравматического остеомиелита длинных трубчатых костей // Хирургия. 1987; 10: 70–74.  
 2. *Беляков Н.А.* Эндогенная интоксикация и лимфатическая система // Эфферентная терапия. 1998; 2: 11–16.  
 3. *Болаташвили И.Ф.* Развитие коллатерального кровоснабжения при переломах длинных трубчатых костей в условиях нарушенного кровообращения // Актуальные вопросы неотложной хирургии и травматологии. М., 1998: 135–139.

4. *Аранович А.М., Паевский С.А., Ремпель Г.Д. и др.* Восстановление сосудистого русла в пораженном сегменте у больных с дефектами костей голени, осложненными хроническим остеомиелитом // Хирургия. 1990; 9: 36–40.

5. *Долганова Т.И., Аранович А.М.* Гемодинамические изменения у больных с хроническим остеомиелитом при лечении методом Илизарова // Анналы травматологии и ортопедии. 1996; 1: 18–21.

6. *Дорохин К.М., Спас В.В.* Патологические аспекты синдрома эндогенной интоксикации // Анестезиология и реаниматология. 1994; 1: 56–60.

7. *Дубикайтис А.Ю.* Острые и хронические эндотоксикозы у хирургических больных: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Санкт-Петербургский государственный институт усовершенствования врачей, 1993: 60.

8. *Егоршина Е.В.* Лабораторно-диагностические критерии эндотоксикоза при острых пневмониях и абсцессах легких, хроническом необструктивном бронхите: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. БГМА, Благовещенск, 2000: 23.

9. *Малахова М.Я.* Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации // Эфферентная терапия. 1995; 1–2: 61–65.

10. *Житницкий Р.Е., Бутуханов В.В., Арсентьева Н.И. и др.* Нарушения регионарного кровотока и воздействие на них в комплексе предоперационной подготовки больных хроническим остеомиелитом // Диагностика, профилактика и лечение раневой инфекции в травматологии и ортопедии: Сб. науч. тр. Иркутск, 2002: 114–118.

11. *Онопrienko Г.А.* Васкуляризация костей при переломах и дефектах. М.: Медицина, 1993: 24.

12. *Долганова Т.И., Горбачева Л.Ю., Аранович А.М., Ключин Н.М.* Периферическая гемодинамика у больных с посттравматическим остеомиелитом голени // Хирургия. 2001; 10: 37–42.

13. Полуавтоматическая и автоматическая расшифровка реограмм: Метод. рекомендации / МЗ РСФСР; сост.: Н.Я. Молоканов, В.А. Миляшин, В.М. Стельмак. Смоленск, 1988: 21.

14. *Стецула В.И., Гунько Ю.Г.* Циркуляторная концепция патогенеза посттравматического остеомиелита // Ортопедия, травматология, протезирование. 1990; 1: 3–5.

15. *Basu S., Eriksson M.* Vitamin E in relation to lipid peroxidation in experimental septic shock // Prostagland., Leukotrienes and Essent. Fatty Acids. 2000; 62 (3): 195–199.

16. *Holmes C.L., Russell J.A., Walley K.R.* Sepsis: Is there room for vasopressin? // Sepsis. 2001; 4 (2): 169–175.

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ, СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Т.В. ЗУБКОВА<sup>1</sup>, Н.К. ФРУНЦЕВИЧ<sup>2</sup>, А.А. ВАЛИГУРА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Медицинская лаборатория «ДЛА», г. Киев

<sup>2</sup> ГВМКЦ «ГВКГ» МО Украины, г. Киев

**Резюме.** В статье предоставлены данные по распространенности возбудителей инфекций, передающихся половым путем, среди населения Украины. Приведены сведения о соотношении возбудителей среди разных возрастных категорий пациентов, проживающих на территории Украины.

**Ключевые слова:** инфекции, передаваемые половым путем, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum/parvum*, полимеразная цепная реакция.

## PREVALENCE OF SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES IN UKRAINE AMONG INDIVIDUALS OF DIFFERENT AGE GROUPS

T.V. ZUBKOVA<sup>1</sup>, N.K. FRUNTSEVICH<sup>2</sup>, A.A. VALIGURA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Medical Laboratory "DILA", Kiev

<sup>2</sup> Central Military Medical Clinical Center «Central Military Clinical Hospital», Ministry of Defense of Ukraine, Kiev

**Summary.** The article presents data on the prevalence of pathogens of sexually transmitted diseases among the population of Ukraine. Information is given on ratio of pathogens among different age categories of patients residing on the Ukraine's territory.

**Key words:** sexually transmitted infections, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum/parvum*, polymerase chain reaction.

### Данные для корреспонденции

Зубкова Татьяна Вадимовна, начальник сектора молекулярно-генетического анализа медицинской лаборатории «ДЛА», Киев, Украина

Киев, ул. Чигорина, 2, тел.: +38-099-097-82-50, e-mail: tanolg@yandex.ru

Инфекционно-воспалительные заболевания уrogenитального тракта — одна из основных причин нарушения репродуктивной функции человека. Из многообразия микроорганизмов, способных вызывать такие заболевания, в первую очередь следует выделить те, этиологическая роль которых считается доказанной. Речь идет о таких возбудителях, как *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, относящихся к группе инфекций, передаваемых половым путем (ИППП). В последние годы накопилось большое количество данных, свидетельствующих о самостоятельной этиологической роли *Mycoplasma genitalium* в воспалительных заболеваниях органов малого таза [1]. В настоящее время изменилась структура ИППП, на первый план вышли заболевания, вызванные условно-патогенными возбудителями; высока частота микст-форм инфекций; увеличилось число случаев инфекций без характерных клинических проявлений, выявляющихся случайным образом. Все это делает невозможной поста-

новку диагноза на основе лишь клинических данных и указывает на необходимость применения лабораторных методов обследования пациента [2]. Ранняя диагностика ИППП имеет большое значение для своевременного лечения, снижающего вероятность осложнений и дальнейшего распространения инфекции. Ведущим методом диагностики при этом является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), использование которого позволяет провести расширенную этиологическую расшифровку ИППП и выбрать оптимальную тактику терапии. Выбор метода ПЦР обусловлен рядом преимуществ, определяющими из которых являются высокая аналитическая чувствительность и диагностическая специфичность [3]. Кроме этого, к преимуществам ПЦР относятся:

- высокая чувствительность и специфичность метода, что дает возможность выявления персистирующих, некультивируемых форм микоплазм;
- выявление генетического материала в малом количестве пробы;

- скорость проведения исследования – быстрое получение результата;
- возможность использования разных видов биологического материала в зависимости от места предполагаемой локализации возбудителя [4].

Целью данной работы явилось изучение распространенности ИППП среди пациентов разных возрастных категорий с помощью ПЦР на территории Украины.

### Материалы и методы

В период с августа по декабрь 2012 г. в медицинскую лабораторию «ДЛА» был направлен клинический материал из разных лечебно-профилактических учреждений Украины для исследования одновременно на 6 возбудителей ИППП – *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealiticum/parvum* методом ПЦР. Исследовали урогенитальные соскобы, мочу, сок простаты, эякулят, полученные от пациентов мужского и женского пола в возрасте от 15 до 75 лет. Все пациенты были разделены на 5 групп: 1-я группа – пациенты в возрасте 15–25 лет, 2-я группа – 26–35 лет, 3-я группа – 36–45 лет, 4-я группа – 46–55 лет, 5-я группа – пациенты старше 56 лет. Из полученных клинических образцов выделяли ДНК с помощью набора «NucleoSpin 96 Quick Pure» (Macherey-Nagel, Германия). Дальнейшее исследование выделенных препаратов ДНК проводили с использованием набора реагентов для ПЦР «Seeplex® STI Master Panel 1 ACE Detection» (Seegene, Корея) согласно инструкции производителя.

### Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал, что частота выявления возбудителей значительно варьировала между пациентами мужского и женского пола, а также между разными возрастными группами пациентов (рис. 1).

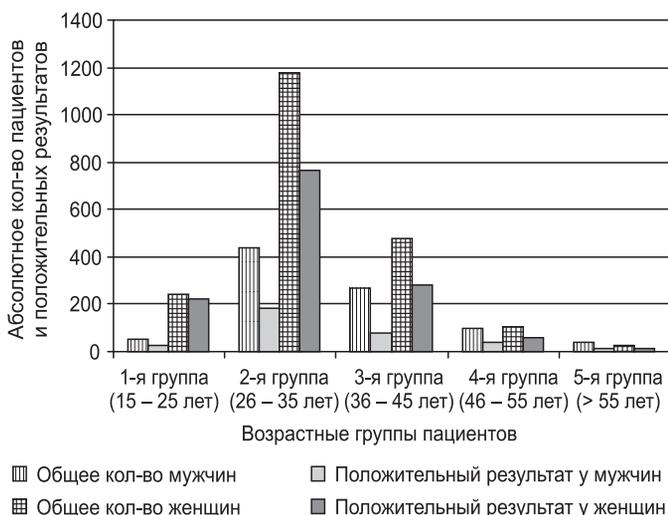


Рис. 1. Соотношение количества анализов и положительных результатов среди обследованных пациентов

Из рисунка 1 видно, что общее количество анализов на ИППП значительно больше у женщин – 2026 анализов (69,2%), нежели у мужчин – 900 анализов (30,8%), и количество положительных результатов у пациенток женского пола (66,2%) практически в два раза превышает таковые у пациентов мужского пола (37,6%). Результаты анализа распространенности ИППП среди обследованных мужчин и женщин свидетельствуют о том, что доля инфицированных мужчин была ниже, чем женщин. Дальнейший анализ позволил определить соотношение тех или иных возбудителей ИППП среди инфицированных пациентов. Из облигатно-патогенных микроорганизмов наиболее распространенным среди мужчин и женщин является *Chlamydia trachomatis*. Наибольший % выявляемости данного микроорганизма наблюдался в возрастной группе до 25 лет. Выявляемость ДНК *Chlamydia trachomatis* в 1-й группе составила 9,2% (13,5% у мужчин, 8,3% у женщин), во 2-й – 5,6% (9,6% у мужчин, 4% у женщин), в 3-й – 3% (5% у мужчин, 1,9% у женщин), в 4-й – 1,5% (2% у мужчин, 1% у женщин) и в 5-й – 0%. Во всех возрастных группах % выявляемости хламидийной инфекции выше у мужчин, чем у женщин. Это может быть связано с тем, что у женщин хламидийная инфекция чаще протекает бессимптомно, а у мужчин остро, что приводит к ранней обращаемости в клинику и своевременной диагностике [5].

По частоте выявления ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* и *Mycoplasma genitalium* среди мужчин и женщин, а также между разными возрастными группами были наибольшие различия. У женщин второй по частоте встречаемости из облигатно-патогенных микроорганизмов был *Trichomonas vaginalis*, в то время как на втором месте у мужчин выявлялся возбудитель *Neisseria gonorrhoeae*. Наибольший % выявляемости ДНК *Neisseria gonorrhoeae* приходится на 1-ю и 4-ю группы (1,02 и 1% соответственно), а ДНК *Trichomonas vaginalis* – на 1-ю (1,4%), 3-ю (1,5%) и 4-ю (2,9%) (рис. 2). Это, вероятно, связано с диагностикой хронических форм заболеваний, обращением пациентов при наличии осложнений, в некоторых случаях со стертой клинической картиной течения заболевания, с меньшими возможностями лабораторной диагностики десятки лет назад.

При обнаружении условно-патогенных микроорганизмов (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealiticum/parvum*) лидирующее положение также занимает возрастная категория до 25 лет. Причем % обнаружения ДНК *Mycoplasma hominis* мало отличается в группах со 2-й по 5-ю. А для ДНК *Ureaplasma urealiticum/parvum* характерно снижение % обнаружения от 1-й группы к 5-й (рис. 3).

В задачи данного исследования не входил анализ клинического статуса пациентов. На данном этапе исследования нас интересовала распространенность основных патогенных возбудителей урогенитальных инфекций. Это имеет большое значение при адекватном назначении лабораторных исследований.

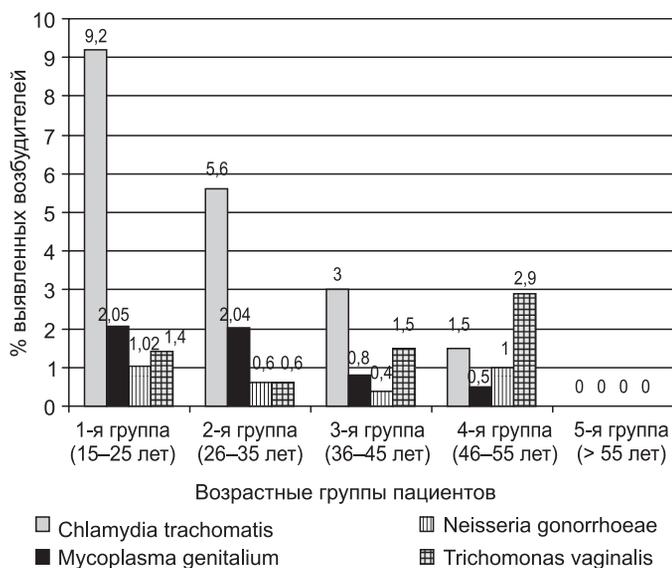


Рис. 2. Соотношение выявленных возбудителей ИППП в разных возрастных группах

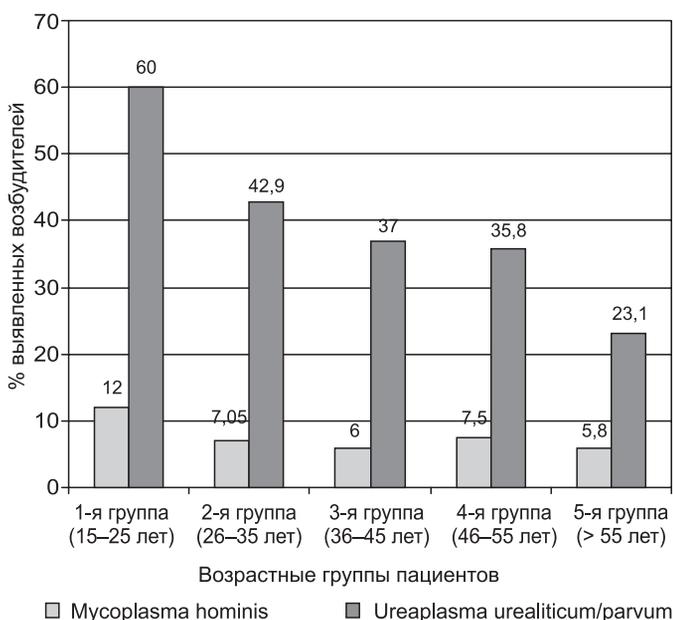


Рис. 3. Соотношение выявленных возбудителей (микоплазм) в разных возрастных группах

**Выводы.** За последние несколько лет разработаны основанные на ПЦР тесты, обладающие по сравнению с классическими тестами более высокой чувствительностью, специфичностью и объективностью полученных результатов. В сочетании с современным оборудованием эти тесты позволяют обнаруживать ДНК нескольких микроорганизмов в одной реакции. Нами был использован тест на основе мультиплексной ПЦР – «Seeplex® STI Master Panel 1 ACE Detection», позволяющий с высокой эффективностью выявлять ДНК одновременно шести возбудителей ИППП в процессе одной реакции. Выявление данных микроорганизмов должно являться базовой диагностической процедурой при обследовании пациентов с инфекционно-воспалительной патологией репродуктивных органов, а также при проведении профилактических обследований.

Таким образом, данное исследование может быть полезным для эпидемиологов, дерматовенерологов, гинекологов в плане прогнозирования вероятности выявления этиологических агентов ИППП в разных возрастных группах населения страны, а также корректного назначения лабораторных исследований.

#### Литература.

1. Гуцин А.Е., Рыжих П.Г., Савочкина Ю.А., Шипулина О.Ю., Шипулин Г.А. Изучение распространенности возбудителей ИППП (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *T. vaginalis*) с помощью ПЦР в реальном времени в формате «МУЛЬТИПРАЙМ» // Клиническая дерматология и венерология. 2011; 4: 90–93.
2. Тимошук Г.И., Туркина И.А. Лабораторные методы диагностики инфекций, передаваемых половым путем // «ОВУМ», г. Кемерово, 2008.
3. Бойцов А.Г., Порин А.А., Белоусова Е.В. и др. Значение ПЦР для диагностики урогенитальных инфекций в практическом здравоохранении // Тезисы докладов 3-й Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика в современной медицине». Москва, 2000: 22–23.
4. Гуцин А.Е., Бурцев О.А., Рыжих П.Г. Мониторинг лечения пациентов с инфекцией, вызванной *M. genitalium*, с помощью методов ПЦР и НАСБА в реальном времени // Клиническая дерматология. 2009; 4: 58–63.
5. Everett K.D.E., Bush R.B., Andersen A.A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five species, and standards for the identification organisms // International Journal of Systematic Bacteriology. 1999; 49: 415–440.

## ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА У ЖЕНЩИН УКРАИНЫ

Н.К. ФРУНЦЕВИЧ<sup>1</sup>, Т.В. ЗУБКОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГВМКЦ «ГВКГ» МО Украины

<sup>2</sup> Медицинская лаборатория «ДЛА», г. Киев

**Резюме.** В работе проанализирована частота встречаемости у пациенток медицинской лаборатории «ДЛА» различных типов вируса папилломы человека, определяемых методом полимеразной цепной реакции. Установлена достаточно высокая частота встречаемости вируса папилломы человека в клинических образцах. Наибольшую частоту встречаемости имеют генотипы 16, 56, 66, 31, 52. Сравнительно более низкие показатели зарегистрированы для 33, 39, 58, 18, 35, 45, 59 типов.

**Ключевые слова:** вирус папилломы человека, папилломавирусная инфекция, полимеразная цепная реакция, тип.

## INCIDENCE OF DIFFERENT TYPES OF HUMAN PAPILLOMAVIRUSES WITH HIGH ONCOGENIC RISK IN WOMEN OF UKRAINE

N.K. FRUNTSEVICH<sup>1</sup>, T.V. ZUBKOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Central Military Medical Clinical Center «Central Military Clinical Hospital», Ministry of Defense of Ukraine

<sup>2</sup> Medical Laboratory «DILA», Kiev

**Summary.** This paper has analyzed the frequency of occurrence various types of human papilloma virus among the patients of Medical Laboratory «DILA» defined by polymerase chain reaction. Established high frequency of human papilloma virus in clinical samples. The most frequent genotypes are 16, 56, 66, 31, 52. The relatively lower rates recorded for 33, 39, 58, 18, 35, 45, 59 types.

**Key words:** human papilloma virus, human papillomavirus infection, polymerase chain reaction, type.

### Данные для корреспонденции

Фрунцевич Наталия Константиновна, врач-иммунолог Главного военно-медицинского клинического центра «ГВКГ» Министерства обороны Украины  
Украина, г. Киев, ул. Госпитальная, 18, тел.: +38 097 694 16 59, e-mail: frnnatalia@ ukr.net

### Введение

В настоящее время в мире отмечается общий рост инфицированности вирусом папилломы человека (ВПЧ), и папилломавирус рассматриваются как основной этиологический фактор развития рака шейки матки [1]. В современных условиях наблюдаются либерализация половых связей, раннее вступление в половую жизнь юношей и девушек, частая смена половых партнеров и большое их количество на протяжении жизни. Эти особенности половой жизни способствуют распространению ВПЧ. Распространенность различных типов ВПЧ неодинакова в разных странах и даже регионах. Во многих странах проводятся организованные скрининговые исследования распространенности различных типов ВПЧ в популяции. В основе таких исследований лежит использование современных молекулярно-биологических методов, позволяющих установить факт инфици-

рования и провести типирование ВПЧ. По мере изучения ВПЧ гибридными методами выяснилось, что риск злокачественного перерождения связан с несколькими типами ВПЧ. Они были обозначены как вирусы высокого риска онкогенного заболевания. Это ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 68 типов. Перечень типов ВПЧ высокого онкогенного риска расширяется за счет уточнения строения ДНК и появления новых типов промежуточного риска. К ВПЧ низкого онкогенного риска относят 6, 11, 42, 43, 44 типы. Отмечено, что 16 тип наиболее часто встречается в ткани плоскоклеточного рака шейки матки, а 18 тип — в ткани железистого рака (аденокарциномы). Установлено, что существуют дозозависимые отношения, т. е. при высоком содержании ДНК ВПЧ в материале, взятом из шейечного канала матки, риск опухоли или неоплазии более вы-

сок и наоборот [4]. Наиболее чувствительным из молекулярных методов исследования в настоящее время признана полимеразная цепная реакция (ПЦР) с типоспецифическими и видоспецифическими праймерами, позволяющая выявлять вирусные последовательности в геноме пораженных клеток в 95–100% случаев [2]. Благодаря использованию ПЦР в настоящее время идентифицировано более 100 типов ВПЧ, подробно описаны более 70 типов, твердо установлен факт, что определенные типы ВПЧ могут инфицировать строго определенный вид эпителия и вызывать характерные изменения [1, 3]. Такие мероприятия позволили значительно улучшить эффективность диагностики папилломавирусной инфекции (ПВИ), снизить частоту онкологических заболеваний, а также оценить эффективность применения профилактических вакцин против ВПЧ-инфекции.

Целью исследования было изучить частоту встречаемости различных типов ВПЧ высокого онкогенного риска у женщин, проживающих на территории Украины, с применением метода ПЦР.

### Материалы и методы

С августа по декабрь 2012 года нами проанализировано 1018 клинических образцов — соскобы эпителия цервикального канала и шейки матки, взятые от женщин разных возрастных категорий. Соскобы производились одноразовыми стерильными урогенитальными зондами. Материал помещали в 0,5 мл транспортной среды в пластиковые пробирки типа «Эппендорф». Экстракцию ДНК проводили с помощью набора NucleoSpin 96 Quick Pure (Macherey-Nagel, Германия). ПЦР-анализ выполняли с помощью тест-системы «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-Ерh» (ЦНИИ Эпидемиологии, Россия), определяющей 12 типов ВПЧ высокого онкогенного риска: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 на термоциклере MyCycler (BioRad, США). Продукты ПЦР анализировали путем электрофореза в 3% агарозном геле, который проводили согласно стандартным методам с последующим окрашиванием гелей бромистым этидием и сканированием в УФ-трансиллюминаторе GelDoc (BioRad, США).

### Результаты и обсуждение

Анализ результатов показал, что частота встречаемости ВПЧ высокого онкогенного риска достаточно высокая среди женского населения Украины — 39,29% клинических образцов имели положительный ПЦР-результат. После проведенного определения типов ВПЧ-положительных образцов установлено, что ПВИ в разных клинических образцах представлена 1–5 типами ВПЧ (рис. 1).

Приведенные выше данные показывают, что в 61% положительных результатов ПВИ представлена только одним типом ВПЧ, в 25% — двумя типами, в 10% — тремя типами и по 2% приходится на клинические образцы, в которых выявлено одновременно четыре или пять ти-

пов. Дальнейший анализ показал, что при ПВИ, представленной одним типом, лидирующим по частоте встречаемости является 16 тип (27,27%), второе место занимает 56 тип (11,57%), третье и четвертое места принадлежат 66 типу (10,74%) и 31 типу 9,5% соответственно. Распространенность остальных типов ВПЧ составляет менее 8% (рис. 2).

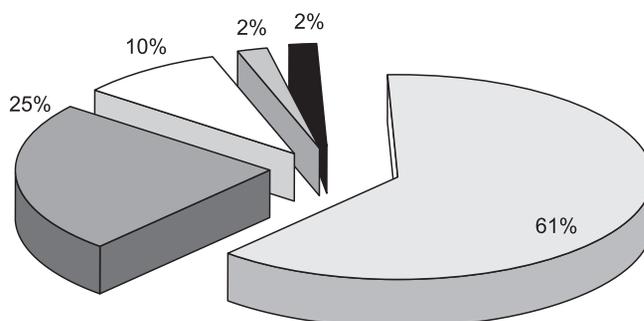


Рис. 1. Соотношение одновременно обнаруживаемых типов ВПЧ при ПВИ

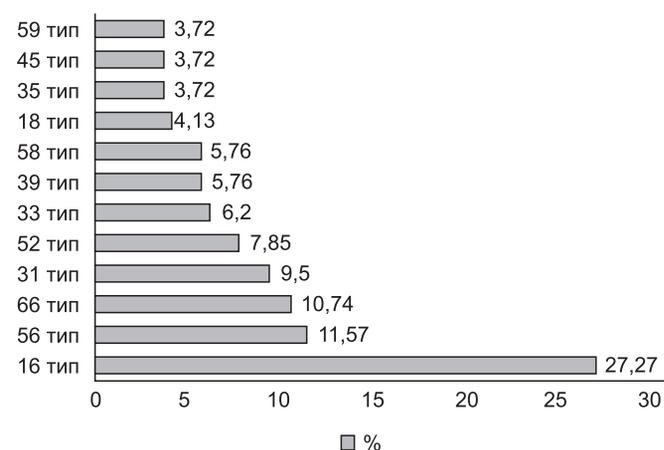


Рис. 2. Частота встречаемости каждого из типов ВПЧ при ПВИ, представленной одним типом

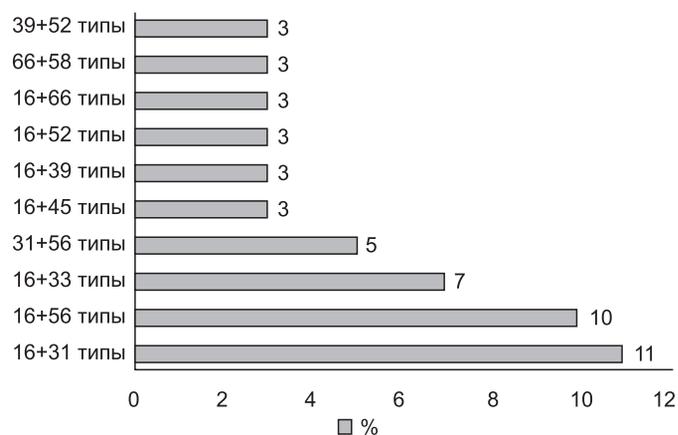


Рис. 3. Комбинации типов ВПЧ при ПВИ, представленной двумя типами

Анализируя данные на рисунке 3, можно сказать, что у женщин, инфицированных двумя типами ВПЧ, в 11% случаев встречался вариант ВПЧ 16+31, в 10% – ВПЧ 16+56, в 7% – ВПЧ 16+33, в 5% – ВПЧ 31+56. По 3% приходится на следующие комбинации типов вируса: ВПЧ 16+45, ВПЧ 16+39, ВПЧ 16+52, ВПЧ 16+66, ВПЧ 66+58, ВПЧ 39+52. Остальные 35 вариантов имели частоту встречаемости 1–2% случаев.

Из 10% клинических образцов, в которых было выявлено три типа ВПЧ, преобладали следующие комбинации: ВПЧ 16+31+33, ВПЧ 16+31+45, ВПЧ 16+31+56, ВПЧ 16+33+52. На вышеуказанные варианты приходилось по 17,14% случаев. Каждый из 29 остальных вариантов встречался менее чем в 3% случаев.

На рисунке 4 видно, что вариант ВПЧ 16+31+52+56 встречается в 23% случаев и занимает первое место среди выявленных комбинаций. Остальные варианты имеют по 11%.

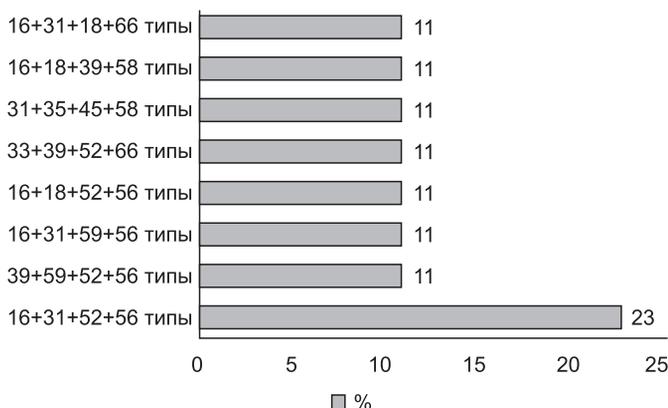


Рис. 4. Комбинации типов ВПЧ при ПВИ, представленной четырьмя типами

Среди женщин, у которых обнаружено пять типов ВПЧ, лидирующим стал вариант ВПЧ 16+39+59+52+66 и составил 28,5% случаев. На остальные пять комбинаций приходится по 14,3%. Обращает наше внимание на себя и тот факт, что ВПЧ 16 встречался во всех вариантах (рис. 5).

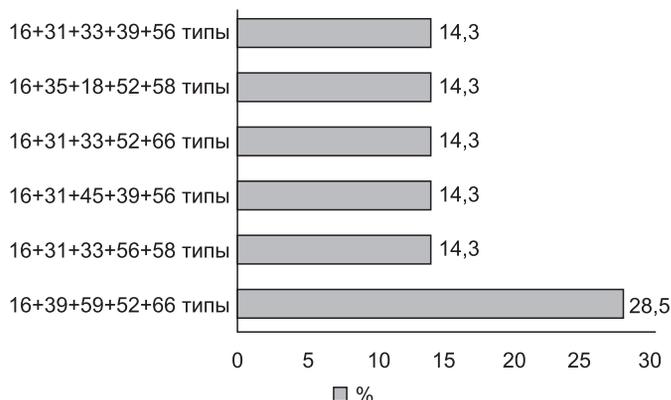


Рис. 5. Комбинации типов ВПЧ при ПВИ, представленной пятью типами

Следует отметить, что выявляемость ДНК ВПЧ 16 типа и его комбинации с другими типами составила 36,75% от общего количества положительных образцов; ВПЧ 56 типа и его комбинации – 18%; ВПЧ 31 типа и его комбинации – 17,75%; ВПЧ 52 типа и его комбинации – 14,25%; ВПЧ 66 типа и его комбинации – 13%; ВПЧ 33 типа и его комбинации – 11,25%. Встречаемость остальных типов и их комбинаций с другими типами составила менее 10%.

**Выводы.** Наши исследования доказывают, что у женщин Украины наблюдается высокий уровень общей инфицированности ВПЧ, с преобладанием ВПЧ 16 типа. Выявленные нами комбинации инфицирования различными типами ВПЧ высокого онкогенного риска могут служить основой для создания эффективных программ по профилактике и лечению ПВИ в Украине.

#### Литература.

1. Дмитриев Г.А., Биткина О.А. Папилломавирусная инфекция. М.: Медицинская книга, 2006: 80.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002: 589.
3. Киселев В.И., Киселев О.И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки. М., 2003: 90.
4. Башмакова М.А., Савичева А.М. Папилломавирусная инфекция (пособие для врачей). Екатеринбург, 2008.

ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет  
им. акад. И. П. Павлова Минздрава 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 ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова  
приглашает на циклы тематического усовершенствования по специальности  
«Клиническая лабораторная диагностика» на факультете последипломного обучения**

**1. Профессиональная переподготовка по клинической лабораторной диагностике**

Проводится в соответствии с Типовой программой дополнительного профессионального образования врачей в объеме 576 часов.

**2. Актуальные вопросы клинической лабораторной диагностики**

Проводится в соответствии с Типовой программой дополнительного профессионального образования врачей в объеме 144 часов (сертификационный).

**3. Управление качеством лабораторных исследований**

*Категория слушателей:* главные врачи, начмеды, заведующие лабораторий, врачи и биологи клинико-диагностических лабораторий, управляющие по качеству. Продолжительность — 144 часа (сертификационный).

*Основные вопросы:* основы менеджмента качества в здравоохранении, общие вопросы управления качеством лабораторных исследований, руководство по качеству, качество преаналитического этапа, метрологические аспекты аналитического этапа, внутрилабораторный контроль качества, межлабораторные сравнения, системы внешней оценки качества, особенности контроля качества при различных лабораторных технологиях, 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, аутсорсинг.

Обзор и разбор основных стандартов ИСО (ГОСТ Р ИСО 9001:2008, 15189–2012, 13485:2003, 14971:2007), Директива 98/79/ЕС ин витро, СЕ маркировка изделий ин витро диагностики, законодательные требования ЕС, Гармонизация требований с директивами ЕС.

**4. Лабораторная диагностика в трансфузиологии**

*Категория слушателей:* заведующие лабораторий, врачи и биологи клинической лабораторной диагностики. Продолжительность — 144 часа (сертификационный).

*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 диагнос-

тика 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»

**5. Молекулярные основы клинической медицины**

*Категория слушателей:* врачи различных клинических специальностей, специалисты клинико-диагностических лабораторий. Продолжительность — 144 часа (сертификационный).

*Основные вопросы:* разбор основных вопросов 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. На основании полученных знаний слушатели приобретают навыки в 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 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 и урологов — принципы диагностики скрытых инфекций мочеполовой сферы, ее эффективности и ограничений. 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, специалисты клиничко-диагностических лабораторий. Продолжительность — 144 часа (сертификационный).

*Основные вопросы:* 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, организация деятельности лабораторной службы с учетом используемых технологий, обеспечение качества лабораторных исследований;

### 7. **Инновационные технологии в лабораторной медицине**

*Категория слушателей:* врачи различных клинических специальностей, заведующие, врачи и биологи клиничко-диагностических лабораторий. Продолжительность — 144 часа (сертификационный).

*Основные вопросы:* формирование устойчивых навыков по формированию алгоритмов лабораторной диагностики с учетом диагностической и аналитической информативности лабораторных технологий. Изучение современной номенклатуры лабораторных исследований, нормативных требований обеспечения преаналитического этапа лабораторной диагностики, международных принципов формирования продуктивного диалога клиники и лаборатории путем обеспечения менеджмента качества. 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. Знакомство с аналитическими характеристиками лабораторных технологий для обеспечения их диагностической информативности при решении клинических задач. Изучение современных подходов формирования референтных диапазонов для оценки результатов лабораторных исследований (группы «нормы», группы «сравнения») с учетом «метод-зависимых» технологий. Освоение технологий лабораторных исследований «в месте лечения», выполняемых нелабораторным персоналом: персоналом клинических подразделений и самими пациентами. Изучение экономических основ лабораторной медицины.

### 8. **Лабораторная диагностика в онкогематологии** (совместно с кафедрой гематологии, трансфузиологии и трансплантологии на базе НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой)

*Основные вопросы:* современная лабораторная диагностика гематологических заболеваний опухолевой природы, а также лабораторный мониторинг ведения больных с этими заболеваниями, включая методы цитогенетического и молекулярного (ПЦР) анализа, в сочетании с морфологическим исследованием и иммунофенотипированием клеток в гистологических препаратах и в жидких средах. Технологическая модернизация лабораторной базы учреждений здравоохранения во многих регионах страны повышает доступность высокотехнологических видов медицинской помощи, но повышает и требования к уровню подготовки кадров по указанному направлению. Кроме того, активное использование в лечении онкогематологических больных возможностей трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) ставит перед лабораториями задачу непрерывного цитогенетического, молекулярно-биологического и биохимического (ELISA) мониторинга эффективности лечения больных, в том числе в целях: а) установления полноты ремиссии заболевания; б) выявления остаточной болезни; и в) контроля уровня концентрации в крови используемых при лечении иммунодепрессантов (циклоsporин-А, такролимус и др.) и цитостатиков, в частности метотрексата. Основной акцент цикла — знакомство слушателей с современными методами цитогенетики, молекулярной биологии и иммунофенотипирования опухолевых элементов.

#### **Учебно-производственный план обучения на бюджетной основе на сайте факультета последипломного обучения университета:**

<http://www.spb-gmu.ru/obrazovanie/poslediplomnoe-obrazovanie/394-glavnaya/obrazovanie/poslediplomnoe-obrazovanie/otdel-dopolnitelnogo-professionalnogo-obrazovaniya/473-otdel-dopolnitelnogo-professionalnogo-obrazovaniya>

Используется кредитно-модульная система с использованием дистанционных образовательных технологий в образовательном процессе в соответствии с ФЗ «Об образовании в РФ».

#### **Отдел комплектации факультета последипломного образования:**

тел.: +7 (812) 234-01-38, 499-71-09, 234-20-88  
e-mail: edudogovor@spb-gmu.ru

#### **Заявку можно направить и на кафедру:**

e-mail: 2339726@gmail.com  
тел./факс: (812) 234-34-07, 233-97-26

Зав. кафедрой, главный специалист-эксперт по клинической лабораторной диагностике Росздравнадзора по Северо-Западному федеральному округу, д. м. н., профессор



В.Л. Эмануэль

## ПЕТЕРБУРГСКИЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ ЗДОРОВЬЯ 16–18 ОКТЯБРЯ 2013

### ПРОГРАММА

#### Петербургского международного форума здоровья

##### ОФИЦИАЛЬНЫЕ МЕРОПРИЯТИЯ

- **Пленарное заседание**  
«Здоровый образ жизни: современные аспекты»
- **Всероссийское совещание** по вопросам развития биотехнологий в АПК в свете «Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года»
- **Конкурс** инновационных биотехнологических решений
- **Конкурсы** профессионального мастерства
- **Конференция** «Инновации в лабораторной диагностике»  
(Организатор: Комитет по здравоохранению Санкт-Петербурга, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава РФ)
- **Конференция** «Предотвращение осложнений кардиологических заболеваний»  
(Организатор: Комитет по здравоохранению Санкт-Петербурга)
- **Симпозиум** «Нарушения зрения: виды, особенности диагностики и оптимальный выбор коррекции»
  - Круглый стол «Современные подходы к контактной коррекции зрения»
  - Круглый стол «Ортокератология»
  - Круглый стол «Актуальные вопросы очковой оптики»(Организатор: Конгресс-медиацентр «МЕДИЦИНА XXI ВЕК»)

##### НАУЧНАЯ ПРОГРАММА

- **Конгресс** «Человек и его здоровье»  
Ортопедия – Травматология – Протезирование – Реабилитация  
(Организатор: МОО «Человек и его здоровье»)
  - **Конференция** «Биомедицина»
    1. Иммуно-генетические исследования как новые методы диагностики заболеваний
    2. Перспективы развития биотехнологий в фармакологии и фармакотерапии
    3. Биомедицинские технологии в персонализированной терапии заболеваний(Организатор: Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова)
  - **Конференция** «Биотехнологические решения для здорового питания нации»  
(Организатор: ЗАО «ЭкспоФорум»)
  - **Конференция** «Актуальные вопросы фармации 2013»  
(Организатор: Фармацевтическая ассоциация Санкт-Петербурга и Северо-Запада)
  - **Конференция** «Модернизация здравоохранения»  
(Организатор: Комитет по здравоохранению Санкт-Петербурга)
  - **Конференция** «Борьба с внутрибольничными инфекциями»  
(Организатор: Комитет по здравоохранению Санкт-Петербурга)
  - **Конференция, презентации** «Медицинские оздоровительные услуги в России и за рубежом»  
(Организатор: Комитет по здравоохранению Санкт-Петербурга, ООО «Примэкс»)
  - **Конференция** «Инвестиции в медицинские центры: технологии, оборудование, персонал»  
(Организатор: ООО «Ивент Менеджмент Групп»)
  - **Научно-практическая конференция** «Новые методы управления медицинскими учреждениями»  
(Организатор: Мессе Дюссельдорф Москва)
  - **Научно-практическая конференция** «Медицина катастроф»  
(Организатор: Мессе Дюссельдорф Москва)
- В программе возможны изменения и дополнения.**  
Подробная информация на сайте:  
[www.pmfz.expoforum.ru](http://www.pmfz.expoforum.ru)

**ПРОГРАММА КОНФЕРЕНЦИИ**  
**«Инновации в лабораторной диагностике»**  
**17 ОКТЯБРЯ 2013 ГОДА**

1. **Кочетов А. Г.**, профессор, главный специалист Министерства здравоохранения РФ по клинической лабораторной диагностике, председатель Профильной комиссии МЗ РФ по клинической лабораторной диагностике  
**«Анализ лабораторных данных в сравнительных эквивалентных испытаниях лекарственных препаратов»**
2. **Имянитов Е. Н.**, д.м.н., руководитель отдела опухолевого роста НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова, заведующий кафедрой медицинской генетики Санкт-Петербургского педиатрического университета, профессор кафедры онкологии (Санкт-Петербург)  
**«Современные возможности и перспективы в области молекулярной онкологии»**
3. **Титов В. Н.**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии и липидного обмена ФГУ РК НПК Росмедтехнологий (Москва)  
**«Биологические основы биодоступности для клеток омега-3 эссенциальных полиеновых жирных кислот»**
4. **Серебрянский И. И.**, руководитель отдела клинических исследований ООО «ГемаКор», врач-гематолог (Москва)  
**«Интегральная in vitro оценка in vivo процессов гемостаза»**



Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования  
**«ПЕРВЫЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ им. акад. И.П. ПАВЛОВА»**  
Научно-образовательный Центр «Институт лабораторной медицины»  
Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга  
Санкт-Петербургское отделение Всероссийского научного общества специалистов лабораторной медицины  
Российская ассоциация медицинской лабораторной диагностики  
Приглашаем вас принять участие в научно-практической конференции:  
**«Лабораторный мониторинг в инфектологии»**  
3 декабря 2013 года

**Программные вопросы конференции:**

1. Клинические аспекты лабораторной диагностики в инфектологии.
2. Современные технологии диагностики сепсиса.
3. Масс-спектрометрия, ПЦР-технология в микробиологической диагностике.
4. Методы диагностики «в месте лечения» (РОСТ) в инфектологии.

**Модераторы конференции:**

*Рахманова А. Г.*, главный инфекционист Комитета по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга, профессор кафедры инфекционных болезней ПСПбМУ им. акад. И. П. Павлова

*Эмануэль В. Л.*, директор Научно-образовательного Центра «Институт лабораторной медицины» ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, главный специалист-эксперт по клинической лабораторной диагностике Росздравнадзора по Северо-Западному федеральному округу, д.м.н., профессор

**Место проведения:** Holiday Inn St. Petersburg – Moskovskye Vorota

**Информационная поддержка:** научно-практический журнал «Клинико-лабораторный консилиум» и издательский холдинг ЗАО «Фарос Плюс» и ЗАО «Отраслевые справочники»

**Справки по телефону:** (812) 233-97-26

По окончании конференции врачам выдаются сертификаты с начислением баллов. В рамках конференции будет организована выставочная экспозиция.

**Технический организатор конференции:**

ГК «Медфорум»

Тел./факс +7 (495) 234-07-34, доб.122; +7 (903) 798-40-01 Полозова Анна, e-mail: orgconf@webmed.ru

**МЕДФОРУМ**  
**ГРУППА КОМПАНИЙ**





**РОССИЙСКАЯ АССОЦИАЦИЯ  
МЕДИЦИНСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

119526, Москва, а/я 117  
Тел./факс (495) 433-2404

Моб. +7 921-430-13-09  
E-mail: vladimirem1@gmail.com



**Федеральная служба по надзору в области здравоохранения  
Главный специалист-эксперт по клинической лабораторной диагностике  
в Северо-Западном федеральном округе**

**УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!**

Сегодня для лабораторий и медицинских учреждений в целом становится все более актуальной задача по стандартизации в формате международных принципов, легализованных в России в системе ГОСТ Р ИСО.

В рамках решения этой задачи сотрудники лабораторий и ЛПУ рассматривают и активно изучают материалы по:

- системам менеджмента качества (СМК) на базе стандартов серии ИСО 9000 для медицинских учреждений;
- системам менеджмента качества на базе стандартов ИСО 15189 и гармонизированных с ним стандартов;
- принципам надлежащей лабораторной и клинической практики (GLP и GCP) для участия в клинических испытаниях фармакологической продукции;
- информации по научной метрологии и обеспечению метрологической корректности результатов исследований;
- актуализации системы управления качеством с использованием лучших мировых технологий (подходы Вестгарда, протоколы и стандарты CLIA и CLSI, СИГМАМЕТРИЯ и др);
- методам повышения экономической эффективности деятельности лабораторий и ЛПУ, включая привлечение новых групп пациентов и т. п.

Для производителей и поставщиков медицинских изделий становится все более актуальной деятельность в соответствии с ГОСТ Р ИСО 13485 как условие эффективной реализации своих возможностей на рынке.

На сегодня наблюдается серьезный информационный «голод» на этом поле.

Нами предлагается использовать информационный портал, в первую очередь ориентированный на медицинские лаборатории различных форм собственности.

Данный портал, потенциально, будет включать в себя следующую информацию:

- детальное описание стандартов и нормативных документов, которые должны и могут быть использованы для построения СМК медицинской лаборатории;
- материалы по разработке и внедрению СМК в лабораториях;

— примеры стандартных документов для лабораторий в открытом доступе (стандартные операционные процедуры, документированные процедуры, регламенты процессов, руководство по качеству, руководство по качеству преаналитического этапа и т. п.);

— методы и практические примеры с мини-программами и таблицами excel для контроля качества с использованием протоколов CLSI, концепции 6 сигм и т. п.;

— обзор и практика по решению проблем с метрологическим обеспечением деятельности медицинских лабораторий;

— авторские статьи, руководства и пособия по СМК в сфере лабораторной медицины;

— организация постоянно действующей «школы» по СМК и контролю качества в сфере лабораторной медицины с использованием on line консультаций, консультаций по E-почте, проведение вебинаров и т. п.

Материалы сайта будут постоянно обновляться, что будет гарантом возврата посетителей.

Предполагается разработка электронного документооборота по СМК лаборатории, интегрированного в ЛИС, а также интеграция современных принципов валидации, верификации на базе стандартов CLSI и сигмаметрии в ЛИС.

Наш адрес: 15189.ru

Моб. тел.: +7-921-430-13-09; +7-911-949-50-89

Директор Научно-образовательного Центра «Институт лабораторной медицины» ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, вице-президент Российской Ассоциации медицинской лабораторной диагностики, главный специалист-эксперт по клинической лабораторной диагностике Росздравнадзора по Северо-Западному федеральному округу, д. м. н., профессор

В. Л. Эмануэль

## 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 научно-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, б/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: [ejvcons@mail.ru](mailto:ejvcons@mail.ru) (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.