



№4 (47) декабрь 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:

Чередниченко Д. В., к. м. н.

Зав. редакцией:

Эмануэль Ю. В., к. м. н.

Редактор перевода:

Филиппова Н. А., к. м. н.

Ответственный секретарь:

Джавлах Е. С.

Адрес редакции:

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

Телефон редакции:

(812) 233 97 26

Эл. почта:

ejvcons@mail.ru

Журнал зарегистрирован

в Федеральной службе

по надзору в сфере связи,

информационных технологий

и массовых коммуникаций

(Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации:

ПИ №ФС77-38698 от 22.01.2010

Учредитель:

ГОУ ВПО «СПб Государственный

медицинский университет

им. акад. И. П. Павлова

Федерального агентства

по здравоохранению

и социальному развитию»

(197022, Санкт-Петербург,

ул. Льва Толстого, д. 6/8)

Журнал издается при поддержке

ООО «АкваТест СПб»

Решением Методического Совета

СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова

от 04.10.2010 журнал является

учебно-методическим пособием

для всех кафедр университета

при реализации циклов повышения

квалификации на ФПО.

Подготовка к печати и печать:

ООО «Издательско-

полиграфическая

компания «КОСТА»»,

тел. **(812) 445 10 02**

Санкт-Петербург,

Новочеркасский пр., д. 58

Тираж 2000 экз.

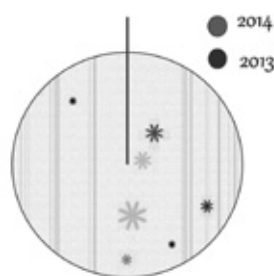
Заказ № 309



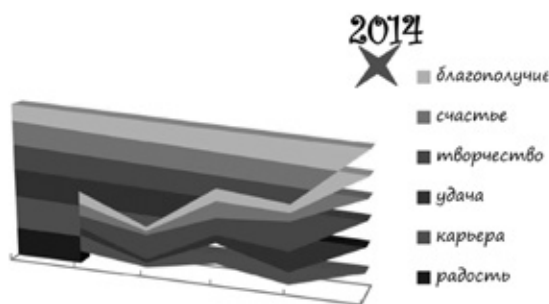
КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ВОТ ЗАКАНЧИВАЕТСЯ 2013 ГОД



ПУСТЬ В НОВОМ ГОДУ
ОДНИ ПОКАЗАТЕЛИ ВЫРАСТУТ..



...А ДРУГИЕ ОСТАНУТСЯ В ПРЕДЕЛАХ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ ВАРИАЦИИ И ЗИМОЙ И ЛЕТОМ



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

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

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

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

Содержание

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ ЖУРНАЛА «КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ»	2
<i>М.М. Данилова, А.С. Готов, Т.В. Сергеева, В.С. Баранов</i> ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ <i>CYP2C9</i> , <i>CYP2C19</i> И <i>MDR1</i> НА РИСК РАЗВИТИЯ ПОБОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВАЛЬПРОАТАМИ БОЛЬНЫХ ЭПИЛЕПСИЕЙ	4
<i>В.В. Вельков</i> ТРЕТЬЕ ВСЕОБЩЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА: РЕШАЮЩЕЕ ЗНАЧЕНИЕ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ТРОПОНИНОВ	12
ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ	28
<i>В.А. Королев, М.О. Макарова</i> КОНТРОЛЬ ГИПЕРГЛИКЕМИИ В КЛИНИКЕ	29
<i>О.В. Тихомирова, Е.В. Бутырина, Н.Н. Зыбина, М.Ю. Фролова</i> КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ И ПОЛИСОМНОГРАФИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ИНСОМНИИ	41
<i>И. В. Корниенко, Т. Г. Фалеева</i> УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ЧЕЛОВЕКА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ, СОДЕРЖАЩИХ МАЛОЕ КОЛИЧЕСТВО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, С ПОМОЩЬЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ DNA IQ (PROMEGA)	49
<i>Л. А. Тетерина, В. Г. Радченко, А. Н. Суворов, П. В. Селиверстов, Е. А. Чихачева</i> ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПЕЧЕНИ И ЛАТЕНТНОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ	54
<i>В.А. Парфенов, И. А. Юдин</i> МЕДИЦИНСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЛАЗЕРОВ	67
ПРИЗНАКИ КВАЛИФИКАЦИИ, ИЛИ «...СЕРВИСНОГО ИНЖЕНЕРА ВЫЗЫВАЛИ?»	75

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *CYP2C9*, *CYP2C19* И *MDR1* НА РИСК РАЗВИТИЯ ПОБОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВАЛЬПРОАТАМИ БОЛЬНЫХ ЭПИЛЕПСИЕЙ

М.М. ДАНИЛОВА^{1, 2}, А.С. ГЛОТОВ^{1, 2}, Т.В. СЕРГЕЕВА³, В.С. БАРАНОВ¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» Северо-Западного отделения РАМН

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

³ Учреждение РАН «Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой»

Резюме. Методом ПЦР-ПДРФ анализа у больных эпилепсией ($N = 76$), а также в популяционной выборке ($N = 210$) был исследован полиморфизм генов, принимающих участие в метаболизме вальпроевой кислоты: гликопротеина P – *MDR1* (3435C > T), цитохромов P450 – *CYP2C9* (430C > T, 1075A > C) и *CYP2C19* (681G > A). У больных с наличием хронических побочных эффектов терапии выявлено статистически значимое увеличение частоты «мутантной» аллели гена *CYP2C9* (1075A > C) по сравнению с лицами без таковых (14,5% и 3,5%, соответственно, $F < 0,03$).

Ключевые слова: эпилепсия, вальпроевая кислота, побочные эффекты, цитохром P450, полиморфизм генов *CYP2C9*, *CYP2C19*, *MDR1*.

ANALYSIS OF SIDE EFFECTS DUE TO VALPROIC ACID IN PATIENTS WITH EPILEPSY RESPECTIVE OF SNPS IN *CYP2C9*, *CYP2C19* AND *MDR1*

M.M. DANILOVA^{1, 2}, A.S. GLOTOV^{1, 2}, T.V. SERGEEVA³, V.S. BARANOV¹

¹ D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology NWD RAMS

² Saint-Petersburg State University

³ Bekhtereva's Institute of Human Brain RAS

Summary. Using of the PCR-RFLP analysis polymorphisms in genes of valproic acid metabolism were studied in patients with epilepsy and in North-Western region population of Russian Federation: P-glycoprotein – *MDR1* (3435C > T), cytochromes P450 – *CYP2C9* (430C > T, 1075A > C) and *CYP2C19* (681G > A).

As compared with unaffected patients, in people with chronic adverse events statistically significant increase of «mutant» allele in gene *CYP2C9* (1075A > C) was identified (3,5% and 14,5%, respectively, $F < 0,03$).

Keywords: epilepsy, valproic acid, adverse events, cytochrome P450, genetic polymorphism in *CYP2C9*, *CYP2C19*, *MDR1*.

Данные для корреспонденции

Данилова М. М., лаборант-исследователь лаборатории пренатальной диагностики врожденных и наследственных заболеваний ФГБУ «НИИАГ им. Д. О. Отта» СЗО РАМН, 199034, Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3., e-mail: elenamariamassa@gmail.com

Введение

Согласно данным ВОЗ, эпилепсия является одной из важнейших проблем здравоохранения. ВОЗ и Международная лига против эпилепсии (International League Against Epilepsy – ИЛАЕ) проводят глобальную кампанию в целях обеспечения лучшей информированности в отношении эпилепсии, а также активизации обще-

ственных и частных усилий, направленных на улучшение помощи и смягчение последствий, этой болезни. Согласно недавним исследованиям до 70% новых диагностированных случаев эпилепсии можно успешно лечить с помощью противоэпилептических препаратов (ПЭП). После лечения в течение 2–5 лет, примерно

в 60–80% случаев лекарственная терапия может быть отменена без возобновления припадков [26]. Однако в процессе лечения нежелательные побочные реакции от приема лекарственных средств часто снижают качество жизни в большей степени, чем сама эпилепсия. Основная проблема в лечении эпилепсии — нахождение баланса между терапевтическим действием ПЭП и их возможными побочными эффектами [3].

Внимание многих исследователей и клиницистов в настоящее время сосредоточено на изучении наследственных факторов, как лежащих в основе самого заболевания, так и влияющих на его лекарственную терапию.

Препаратом выбора при изолированных первично-генерализованных тонико-клонических приступах, изолированных абсансах, тонических приступах, юношеской абсансной и миоклонической формах эпилепсии, а также при фотосенситивной эпилепсии, синдроме Леннокса–Гасто и других эпилептических энцефалопатиях является вальпроевая кислота (ВК). Широкий противоэпилептический эффект ВК может объясняться сочетанием клеточного и нейрофизиологического механизмов действия [3, 13, 14]. Для приема внутрь у взрослых и детей с массой тела более 25 кг начальная доза составляет 10–15 мг/кг в сутки. Эффективность терапии определяется наличием терапевтической концентрации препарата в крови (наилучшая концентрация препарата составляет 75–90 мг/л). Опытным путем показано, что концентрация ВК в крови не всегда зависит

от массы тела. При повышении концентрации препарата в крови быстрее проявляются побочные эффекты терапии: повышение уровня АЛТ, АСТ, билирубина, щелочной фосфатазы, амилазы сыворотки крови, снижение уровня карнитина. Другими побочными реакциями на препараты ВК являются: желудочно-кишечные расстройства (тошнота, рвота, повышение или снижение аппетита, панкреатит), эндокринные и обменные нарушения (увеличение веса, нарушение секреции инсулина, поликистоз яичников, нарушение менструального цикла, гипотиреоз), гепатотоксичность (повышение уровня печеночных ферментов, жировое перерождение печени), гематологические реакции (тромбоцитопения, лейкопения, нейтропения, анемия), нарушение функции почек и развитие остеопороза [14]. Показано, что женщины детородного возраста более чувствительны к специфическим побочным действиям ВК, таким как негативное влияние на репродуктивную функцию, повышение массы тела и синдром поликистозных яичников, снижение эффективности гормональной контрацепции [3].

Частота и тяжесть побочных эффектов зависят от того, как вальпроевая кислота метаболизируется в организме человека. Показано существование четырех независимых метаболических путей: связывание с глюкуроновой кислотой, β -окисление, ω 1- и ω 2-окисление при помощи изоферментов цитохрома P-450 [11, 20, 21] (см. рис. 1).

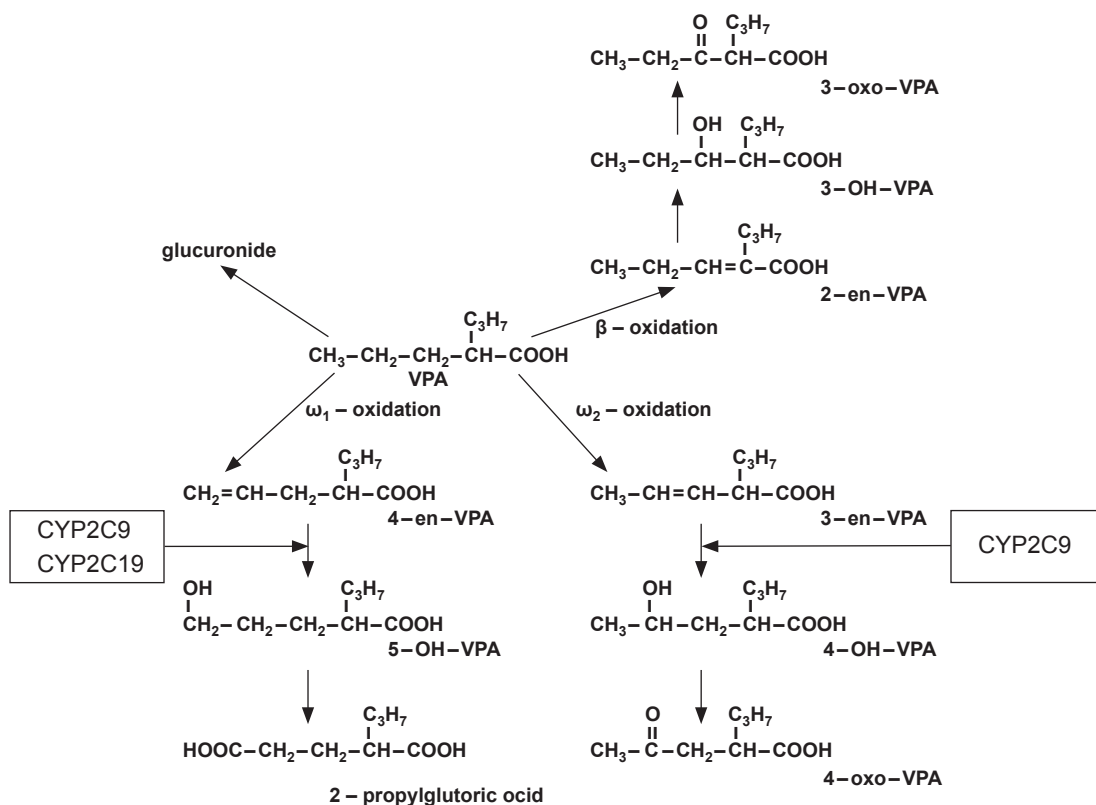


Рис. 1. Метаболические пути вальпроевой кислоты [11]

В метаболизме ВК принимают участие в основном ферменты CYP2C9 и CYP2C19 [16, 23]. Для терапии препаратами ВК наиболее важен ω -1 путь окисления, поскольку в этом случае образуется активный метаболит — 4-ен-ВК, который оказывает основное лечебное действие, но одновременно является токсичным веществом. Ферменты системы детоксикации ксенобиотиков, переводя 4-ен-ВК в 5-ОН-ВК, снижают токсичность ВК, но при этом и ослабляют терапевтический эффект [8, 15, 24].

Полиморфизм генов цитохромов **CYP2C9** и **CYP2C19** был установлен как фактор, влияющий на продукцию ферментов со сниженной активностью (так называемые медленные метаболиты) [10, 22].

Также для определения эффективности и безопасности терапии эпилепсии препаратами ВК важное значение имеет функциональный статус транспортного белка гликопротеина Р, который кодируется геном **MDR1** [17]. Гликопротеин Р экспрессируется в различных органах и контролирует АТФ-зависимое удаление ксенобиотиков из клетки [12]. Полиморфизм гена **MDR1** представляет большой интерес для фармакогенетики. Наиболее значимой для функционирования продукта гена **MDR1** является замена **3435C > T** [9, 12, 26]. У гомозигот по аллели **T** функции гликопротеина Р нарушены, что может стать причиной тяжелой интоксикации в случае применения целого спектра лекарств.

Цель исследования заключалась в поиске ассоциации аллелей генов **CYP2C9** (**430C > T** и **1075A > C**), **CYP2C19** (**681G > A**) и **MDR1** (**3435C > T**) с безопасностью и эффективностью терапии вальпроевой кислотой больных эпилепсией.

Материалы и методы

Создание коллекций образцов ДНК и формирование групп

Нами была создана коллекция образцов ДНК 76 человек, страдающих эпилепсией. В качестве группы сравнения была взята популяционная выборка, которую составили 210 человек — жителей Северо-Западного региона России (см. табл. 1).

Постановка диагноза «эпилепсия» основывалась на:

- данных клинической картины заболевания (возраст манифестации заболевания, характер первых приступов, наличие или отсутствие миоклонуса, наличие

или отсутствие очаговой неврологической симптоматики, наличие фотосенситивности);

- результатах ЭЭГ-видеомониторинга, магнитно-резонансной томографии, позитронно-эмиссионной томографии с целью локализации очага эпилептической активности.

Дозы ВК в данном исследовании варьировали от 500 до 2100 мг/день в зависимости от формы заболевания и тяжести возникающих нежелательных побочных реакций (НПР). Методами выявления НПР являлись:

- пятикратный осмотр и опрос пациентов в процессе терапии лечащим врачом;
- оценка лабораторных данных, данных неврологического осмотра и дополнительных исследований (УЗИ брюшной полости, органов малого таза).

Оценка динамики НПР производилась объективно и на основании жалоб пациентов в процессе исследования при повторных визитах к лечащему врачу. В исследовании использовалась редуцированная шкала Наранжо (из опроса был исключен вопрос о плацебо). Таким образом, суммарный балл по редуцированной шкале составлял 8–9 баллов [19].

Выделение ДНК

Образцы ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови фенольным методом [7] или в соответствии с методикой Миллер с соавт. с некоторыми модификациями [18].

Анализ образцов ДНК

Для исследования полиморфизма генов **CYP2C9** (*2: **430C>T**, *3: **1075A>C**), **CYP2C19** (*2: **681G>A**) и **MDR1** (**3435C>T**) был использован метод ПЦР-ПДРФ.

Полимеразная цепная реакция

Нуклеотидные последовательности искомым фрагментов генов получали из интернет-базы «Nucleotide» («NCBI», США). Праймеры, необходимые для амплификации этих фрагментов, подбирали с использованием программы «Oligo 6» (США). Специфичность праймеров проверяли в программе «Nucleotide-nucleotide BLAST» («NCBI», США).

Реакционная смесь (25 мкл) для ПЦР содержала 67 мМ Трис-НСl (рН 8,6), 166 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Тритон X-100, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого из dNTP («Силекс», Россия), 2,5 ед. акт. Таq-полимеразы («Си-

Таблица 1. Сравнительные характеристики исследованных групп

	Популяционная выборка	Группа больных эпилепсией
Общее число, N	210	76
Мужчины, N	106	26
Женщины, N	104	48

Таблица 2. Условия анализа полиморфизма генов *CYP2C9*, *CYP2C19* и *MDR1* методом ПЦР-ПДРФ

Гены	<i>CYP2C9</i> *2	<i>CYP2C9</i> *3	<i>CYP2C19</i>	<i>MDR1</i>
Полиморфизм	430C > T	1075A > C	681G>A	3435C>T
Структура праймеров	F: 5'-CTCCCTCAT GACGCTGCGGAAT-3' R: 5'-TCATAATGA AAGATATGGCCAC-3'	F: 5'-GTGCACGAGG TCCAGAGATGC-3' R: 5'-GGAGAACACA CACTGCCAGAC-3'	F: 5'-CCAGAGCTTGG CATATTGTATCTATAACC-3' R: 5'-CTTCTCAAGCATTAC TCCTTGACCTG-3'	F: 5'- CTGGTCCTGAAG TTGATCTGTGAAC-3' R: 5'- CATTAGGCAGTG ACTCGATGAAGG-3'
Условия ПЦР	95° С – 5 мин; 95° С – 30 с; 60° С – 30 с; 72° С – 1 мин; закл. синтез 72° С – 5 мин			
Эндонуклеаза рестрикции	<i>Bme</i> 18 I	<i>Zsp</i> 2 I	<i>Sma</i> I	<i>Mbo</i> I
Размеры фрагментов	C/C 155 п.о. и 49 п.о. C/T 204 п.о., 155 п.о. и 49 п.о. T/T 204 п.о.	A/A 275 п.о. и 22 п.о. A/C 297 п.о., 275 п.о. и 22 п.о. C/C 297 п.о.	G/G 251 п.о. и 110 п.о. G/A 361 п.о., 251 п.о. и 110 п.о. A/A 361 п.о.	C/C 186 п.о. и 59 п.о. C/T 245 п.о., 186 п.о. и 59 п.о. T/T 245 п.о.

лекс», Россия), смесь оригинальных праймеров: *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2 и *MDR1* по 0,4 пМ каждого из прямых и обратных праймеров (в отдельной пробирке для каждого из генов) и ДНК-матрицу (1 мкл).

Реакцию амплификации проводили при режимах, указанных в таблице 2.

Гидролиз эндонуклеазами рестрикции

Ферментативный гидролиз ПЦР-продукта гена *CYP2C9**2 эндонуклеазой *Bme*18 I («СибЭнзим», Россия) проводили при 37 °С в течение ночи в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл «амплификата», 10 мкл ампулированной воды, 1,5 мкл буфера (рекомендованного производителем) и 0,5 мкл фермента. Рестриктию ПЦР продукта гена *CYP2C9**3 эндонуклеазой *Zsp*2 I («СибЭнзим», Россия) проводили при 37 °С в течение ночи в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл «амплификата», 10 мкл ампулированной воды, 1,5 мкл буфера (рекомендованного производителем), 0,5 мкл фермента. Рестриктию ПЦР продукта гена *CYP2C19* эндонуклеазой *Sma*1 («СибЭнзим», Россия) проводили при 25 °С в течение ночи в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл «амплификата», 10 мкл ампулированной воды, 1,5 мкл буфера (рекомендованного производителем), 0,5 мкл фермента. Рестриктию ПЦР продукта гена *MDR1* эндонуклеазой *Mbo* I («СибЭнзим», Россия) проводили при 37 °С в течение

ночи в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл «амплификата», 10 мкл ампулированной воды, 1,5 мкл буфера (рекомендованного производителем), 0,5 мкл фермента.

Визуализация результатов в полиакриламидном геле (ПААГ)

Полноту гидролиза (размеры ДНК-фрагментов указаны в табл. 2) оценивали по результатам электрофореза в 6% полиакриламидном геле с последующей окраской этидиумбромидом и визуализацией в проходящем УФ свете.

Методы статистической обработки данных

Для сравнения исследуемых групп по частотам генотипов и аллелей отдельных генов был использован стандартный критерий χ^2 и точный критерий Фишера (F) [4], а также пакет программ «GraphPad InStat» (США). Критический уровень значимости для отвержения нулевой гипотезы принимали равным 0,05.

Результаты

Частоты генотипов и аллелей генов *CYP2C9*, *CYP2C19* и *MDR1* в изученных группах, а также значения p и χ^2 , полученные при сравнении частот генотипов и аллелей в каждой из исследованных групп с таковыми

Таблица 3. Частоты генотипов и аллелей генов *CYP2C9*, *CYP2C19* и *MDR1* у больных эпилепсией и в популяционной выборке

Гены и группы	Частоты аллелей, %		Значения p и χ^2	Частоты генотипов, %			Значения p и χ^2
	С	Т		С/С	С/Т	Т/Т	
<i>CYP2C9</i>*2			P = 0,333 $\chi^2 = 0,9373$	С/С	С/Т	Т/Т	P = 0,2066 $\chi^2 = 3,154$
Эпилепсия (n = 76)	87,5	12,5		75	25	0	
Популяция (n = 210)	90,72	9,28		82,38	16,67	0,95	
<i>CYP2C9</i>*3	А	С	P = 0,7 $\chi^2 = 0,1485$	А/А	А/С	С/С	P = 0,7255 $\chi^2 = 0,6413$
Эпилепсия (n = 76)	91,45	8,55		84,2	14,47	1,32	
Популяция (n = 210)	92,86	7,14		86,2	13,3	0,47	
<i>CYP2C19</i>*2	Г	А	P = 0,7145 $\chi^2 = 0,1338$	Г/Г	Г/А	А/А	P = 0,881 $\chi^2 = 0,2534$
Эпилепсия (n = 76)	84,21	15,79		72,37	23,68	3,95	
Популяция (n = 210)	86,39	13,61		74,75	22,28	2,97	
<i>MDR1</i>	С	Т	P = 0,3629 $\chi^2 = 0,8278$	С/С	С/Т	Т/Т	P = 0,5567 $\chi^2 = 1,172$
Эпилепсия (n = 76)	46,05	53,95		23,68	44,74	31,58	
Популяция (n = 210)	41,27	58,73		17,99	46,56	35,45	

в популяционной выборке, представлены в табл. 3. Распределение соответствующих генотипов по всем генам в исследуемых группах соответствовало распределению Харди–Вайнберга ($p > 0,05$; $\chi^2 < 3,84$).

Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей между выборкой больных эпилепсией и популяционной группой не выявил статистически значимых различий, подтвердив факт того, что полиморфизм изучаемых генов не вносит вклада в развитие данного заболевания.

Из общей группы людей, страдающих эпилепсией, были выделены две подгруппы, различающиеся степенью выраженности нежелательных побочных реакций при терапии вальпроатами. Появление и динамика побочных эффектов выявлялись как с помощью пятикратного опроса пациентов на предмет жалоб, так и путем проведения соответствующих анализов, если побочные эффекты оказывались достаточно тяжелыми. Первую подгруппу составили лица с хроническими побочными эффектами терапии (38 человек), вторую — с отсутствием таковых, а также с обратимыми и дозозависимыми реакциями (29 человек).

Были обнаружены различия в распределении частот генотипов и аллелей по гену *CYP2C9**3 ($P = 0,05$, $F = 0,032$ и $P = 0,04$, $F = 0,024$ для генотипов и аллелей, соответственно) (см. рис. 2). «Мутантная» аллель гена *CYP2C9**3 характеризуется считыванием с нее фермента с очень сильным (вплоть до 100%) снижением активности. Это должно приводить к накоплению такого продукта метаболизма, как 4-ен-ВК, который оказывает токсическое

действие. Повышенная частота встречаемости данной аллели в подгруппе с хроническими побочными эффектами хорошо согласуется с выдвинутой гипотезой.

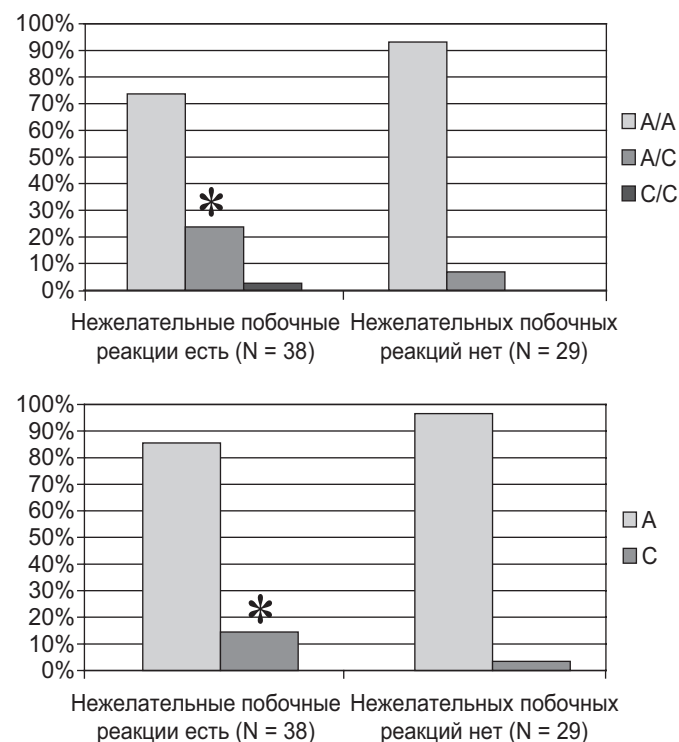


Рис. 2. Распределение частот генотипов (слева) и аллелей (справа) гена *CYP2C9**3 в подгруппах больных эпилепсией

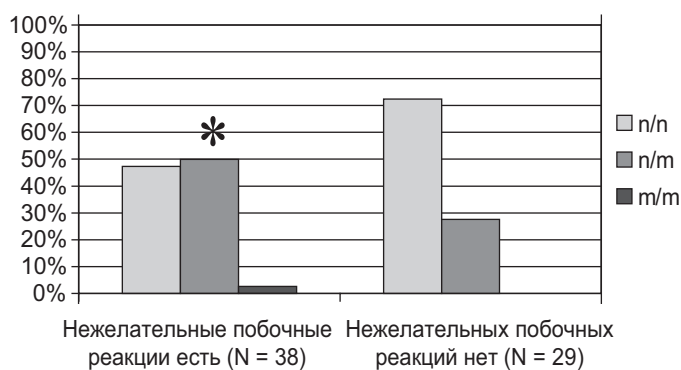


Рис. 3. Распределение частот комбинации генотипов по гену *CYP2C9* в подгруппах больных эпилепсией с различной степенью выраженности нежелательных побочных реакций на терапию

Примечание: здесь n/n означает полное отсутствие у индивида мутантных аллелей *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* гена *CYP2C9*, n/m указывает на то, что в геноме есть хотя бы одна мутантная аллель, обуславливающая сниженную активность фермента, m/m — обе аллели гена несут SNP.

Также выявлено различие в распределении частот комбинации генотипов по гену *CYP2C9*. В подгруппе с наличием хронических побочных эффектов терапии отмечалась более высокая частота аллелей со сниженной активностью фермента ($P = 0,0485$, $F = 0,049$) (см. рис. 3).

Различий в распределении частот генотипов и аллелей по другим изученным генам в подгруппах больных выявлено не было (см. табл. 4).

Обсуждение

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что безопасное и эффективное применение большинства препаратов напрямую зависит от наследственных факторов. К настоящему времени выявлен целый ряд генов, ассоциированных с риском развития побочных эффектов при приеме тех или иных лекарственных средств [5, 6].

Длительное время основным методом терапии эпилепсии являлся эмпирический подбор сочетания препаратов различного спектра действия. До сих пор терапия нередко начинается с применения сразу нескольких ПЭП. Важно отметить, что не существует универсального противосудорожного препарата, одинаково эффективного для разных типов приступов и форм эпилепсии. В настоящее время стандартом лечения во всем мире признаны такие ПЭП, как вальпроат натрия и карбамазепин, — именно данные антиконвульсанты являются в большинстве случаев «стартовой терапией».

Важным шагом в усовершенствовании лечения и профилактике побочных эффектов может стать определение полиморфизма генов *CYP2C19*, *CYP2C9* и *MDR1* у пациентов с эпилепсией, принимающих ВК.

Биотрансформация и/или детоксикация всех ксенобиотиков (чужеродных веществ), в том числе любых лекарственных препаратов, попадающих в организм, обеспечивается сложной метаболической системой, представленной группами ферментов, функционирую-

Таблица 4. Частоты генотипов и аллелей по генам *CYP2C9*, *CYP2C19* и *MDR1* в подгруппах больных эпилепсией

Гены и подгруппы	Частоты аллелей, %		Значения p и χ^2	Частоты генотипов, %			Значения p и χ^2
	С	T		C/C	C/T	T/T	
<i>CYP2C9*2</i>			$P = 0,8191$ $\chi^2 = 0,0523$	C/C	C/T	T/T	$P = 0,8057$ $\chi^2 = 0,0605$
Есть НПР (n = 38)	86,84	13,16		73,68	26,32	0	
Нет НПР (n = 29)	92,86	7,14		79,31	20,69	0	
<i>CYP2C9*3</i>	A	C	$P = 0,04^*$ $F = 0,024^*$	A/A	A/C	C/C	$P = 0,05^*$ $F = 0,032^*$
Есть НПР (n = 38)	85,53	14,47		73,68	23,68	2,63	
Нет НПР (n = 29)	96,55	3,45		93,1	6,9	0	
<i>CYP2C19*2</i>	G	A	$P = 0,6304$ $\chi^2 = 0,2316$	G/G	G/A	A/A	$P = 0,7921$ $\chi^2 = 0,4661$
Есть НПР (n = 38)	81,58	18,42		68,42	26,32	5,26	
Нет НПР (n = 29)	86,21	13,79		75,86	20,69	3,45	
<i>MDR1</i>	C	T	$P = 0,3286$ $\chi^2 = 0,9542$	C/C	C/T	T/T	$P = 0,4702$ $\chi^2 = 1,509$
Есть НПР (n = 38)	43,42	56,58		18,42	50	31,58	
Нет НПР (n = 29)	53,45	46,55		31,03	44,83	24,14	

Примечание: для гена *CYP2C9*3* была произведена дополнительная обработка данных точным критерием Фишера.

щих по каскадному принципу [5, 6]. Гены, контролирующие синтез соответствующих ферментов, ранее называли генами «внешней среды» (environmental genes) [1]. В настоящее время их объединяют под общим названием «гены метаболизма» [2]. Первую фазу биотрансформации обеспечивают такие ферменты, как цитохромы P450. Суперсемейство цитохромов P-450 (CYP-450) отвечает за микросомальное окисление и представляет собой группу ферментов, имеющих множество изоформ (более 1000), которые осуществляют не только метаболизм лекарств, но и участвуют в синтезе стероидных гормонов, холестерина, простаноидов и др. веществ [6].

Важным критерием оценки эффективности проводимого лечения являются возникновение и агgravация (увеличение тяжести) НПР, которые на фоне снижения частоты и тяжести эпилептических припадков могут значительно ухудшать качество жизни больного. Лечение эпилепсии предполагает длительный прием ПЭП, но иногда через некоторое время после начала приема ранее назначенный препарат приходится заменять другим. Одной из важных причин вынужденной замены препарата являются вызываемые им нежелательные побочные реакции. Различают острые и хронические токсические эффекты, которыми обладают ПЭП. Среди них выделяют неспецифические дозозависимые, специфические фармакодинамические эффекты для данного препарата и редкие, но потенциально опасные для жизни пациента реакции идиосинкразии. Первые два типа реакций обычно могут быть своевременно диагностированы и предотвращены. Последний тип реакций, как правило, непредсказуем и развивается очень быстро, что практически не позволяет провести диагностику на доклинической стадии.

В нашем исследовании НПР были условно разделены на три типа: обратимые (пропадают при отмене препарата или корректируются с помощью диеты и т. п.), дозозависимые (проявляются либо снижаются при изменении дозировки препарата) и хронические, когда в организме происходят значительные нарушения жизненно важных функций (см. табл. 5).

Плохо функционирующий продукт гена **MDR1** увеличивает риск развития побочных эффектов, связанных с образованием в процессе метаболизма токсичных продуктов. Из приведенной выше табл. 4 видно, что у лиц с хроническими побочными эффектами повышена частота генотипов, содержащих «мутантную» аллель, на 12,6% и частота самой аллели, блокирующей действие гликопротеина P, на 10%. Несмотря на то, что ассоциации между полиморфизмом гена **MDR1** и развитием побочных эффектов выявлено не было, повышенная частота аллели **T** может свидетельствовать о важной роли гликопротеина P в коррекции терапии больных эпилепсией, но это положение нуждается в дополнительной проверке.

Согласно полученным данным, частоты аллелей и генотипов по генам **CYP2C9**, **CYP2C19** и **MDR1**, продукты которых играют ведущую роль в метаболизме вальпроевой кислоты, у больных эпилепсией в целом не отличались от соответствующих показателей среди жителей Северо-Западного региона России. Однако в подгруппах больных с эпилепсией в зависимости от наличия или отсутствия побочных реакций, была показана ассоциация побочных эффектов терапии с наличием аллели гена **CYP2C9**, снижающей активность фермента, тогда как продукт гена **CYP2C19**, по-видимому, задействован в детоксикации метаболита 4-ен-ВК в меньшей степени.

Поскольку часть больных эпилепсией получает терапию несколькими препаратами одновременно, это может отражаться на ее эффективности и одновременно увеличивать риск НПР. Таким образом, информация об аллельных вариантах генов **CYP2C9**, **CYP2C19** и **MDR1** у конкретного больного позволяет оптимизировать дозировку препаратов ВК, спрогнозировать развитие НПР, сделать терапию более эффективной, то есть персонафицированной и менее токсичной.

Дальнейшие исследования для внедрения фармакогенетического подхода к персонализации терапии в клиническую практику предполагают поиск генетических причин заболевания и возникновения нежелательных эффектов терапии с использованием метода полногеномного секвенирования.

Таблица 5. Распределение больных в соответствии с возникновением жалоб при приеме препаратов вальпроевой кислоты

Тип нежелательных побочных реакций	N	%
Обратимые и дозозависимые	14	18,5
Хронические	38	50
Отсутствуют	15	19,7
Не оценены	9	11,8

Работа выполнена при частичной поддержке грантом СПбГУ № 1.38.79.2012.

Литература

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э. и соавт. Генетический статус человека и гены «предрасположенности» (Введение в предиктивную медицину). СПб., 2000: 263 с.
2. Баранова Е. ДНК: знакомство с собой, или Как продлить молодость. М.: АСТ; СПб.: Астрель-СПб, 2006: 222 с.
3. Воронкова К.В., Пылаева О.А., Косякова Е.С. и соавт. Современные принципы терапии эпилепсии // Журнал неврологии и психиатрии. 2010; 6: 24–36.
4. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991: 271 с.
5. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. М.: Реафарм, 2004: 144 с.
6. Кукес В.Г., Сычев Д.А., Раменская Г.В. и соавт. Клиническая фармакогенетика. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007: 248 с.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984: 480 с.
8. Baillie T.A. Metabolic activation of valproic acid and drug-mediated hepatotoxicity. Role of the terminal olefin, 2-n-propyl-4-pentenoic acid // Chem. Res. Toxicol. 1988; 1: 195–199.
9. Benish R.L., Rodriguez B., Zimmerman P.A. et al. Comparative description of haplotype structure and genetic diversity of MDR1 (ABCB1) in HIV-positive and HIV-negative populations // Infect. Genet. Evol. 2009.
10. Bozina N., Granic P., Lalic Z. et al. Genetic Polymorphisms of Cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian Population // Croat. Med. J. 2003; 44: 425–428.
11. Cotariu D., Zaidman J.L. Valproic Acid and the Liver // Clin. Chem. 1988; 34/5: 890–897.
12. Fung K.L., Gottesman M.M. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function // Biochim. Biophys. Acta. 2009; 1794 (5): 860–871.
13. Glauser T., Ben-Menachem E., Bourgeois B. et al. ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes // Epilepsia. 2006; 47: 1094–1120.
14. Guerrini R. Valproate as a mainstay of therapy for pediatric epilepsy // Paediatr. Drugs. 2006; 8 (2): 113–129.
15. Kassahun K., Farrell K., Abbott F.S. Identification and characterization of the glutathione and N-acetylcysteine conjugates of (E)-2-propyl-2,4-pentadienoic acid, a toxic metabolite of valproic acid, in rats and humans // Drug Metab. Dispos. 1991; 19: 525–535.
16. Kiang T. K.L., Ho P.C., Anari M.R. et al. Contribution of CYP2C9, CYP2A6, and CYP2B6 to Valproic Acid Metabolism in Hepatic Microsomes from Individuals with the CYP2C9*1/*1 Genotype // Toxicol. Sci. 2006; 94 (2): 261–271.
17. Loscher W., Delanty N. MDR1/ABCB1 polymorphisms and multidrug resistance in epilepsy: in and out of fashion // Pharmacogenomics. 2009; 10 (5): 711–713.
18. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells // Nucleic Acids Res. 1988; 16 (3): 1215.
19. Naranjo C.A., Busto U., Sellers E.M. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. // Clin. Pharmacol. Ther. 1981; 30: 239–245.
20. Prickett K.S., Baillie T.A. Metabolism of valproic acid by hepatic microsomal cytochrome P-450 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984; 122: 1166–1173.
21. Rettie A.E., Rettenmeier A.W., Howald W.N. et al. Cytochrome P-450-catalyzed formation of delta4-VPA, a toxic metabolite of valproic acid // Science. 1987; 235: 890–893.
22. Scordo M.G., Caputi A.P., D'Arrigo C. et al. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 & CYP2D6 in an Italian population // Pharm. Res. 2004; 50: 195–200.
23. Tanaka E. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions between antiepileptic drugs // J. Of Clin. Pharmacol. And Therap. 1999; 24: 87–92.
24. Tang W., Borel A.G., Fujimiya T. et al. Fluorinated analogues as mechanistic probes in valproic acid hepatotoxicity: Hepatic microvesicular steatosis and glutathione status // Chem. Res. Toxicol. 1995; 8: 671–682.
25. Vahab S.A., Sen S., Ravindran N. et al. Analysis of Genotype and Haplotype Effects of ABCB1 (MDR1) Polymorphisms in the Risk of Medically Refractory Epilepsy in an Indian Population // Drug Metab. Pharmacokinet. 2009; 24 (3): 255–260.
26. Всемирная Организация Здравоохранения: <http://www.who.int/ru>

ТРЕТЬЕ ВСЕОБЩЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА: РЕШАЮЩЕЕ ЗНАЧЕНИЕ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ТРОПОНИНОВ

В.В. ВЕЛЬКОВ

ЗАО «ДИАКОН», г. Пушкино, Московская область

Резюме. Краткий обзор развития методов лабораторной диагностики, включающих измерение циркулирующих концентраций кардиальных биомаркеров, и эволюции диагностических критериев инфаркта миокарда. Особое внимание уделяется сравнению чувствительности и специфичности по отношению к диагностике ИМ таких маркеров, как креатининкиназа МБ и кардиальные тропонины. Кратко излагаются основные положения международных рекомендаций, касающихся диагностических критериев ИМ, в частности, критерии ИМ, сформулированные в 1979 г. ВОЗ, и затем всеобщие («универсальные») определения ИМ, сформулированные в 2000, 2007 и в 2012 гг. Особое внимание уделено методам высокочувствительного измерения уровней тропонинов и проблемам, связанным с интерпретацией их результатов. Основное внимание уделено краткому изложению принципов и рекомендаций, содержащихся в текущем, уже третьем всеобщем определении ИМ.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, диагностика, высокочувствительный тропонин.

THIRD GENERAL DEFINITION OF MYOCARDIAL INFARCTION: FINAL ROLE OF HIGH SENSITIVITY TROPONINS DETERMINATION

V.V. VELKOV

ZAO "DIAKON", Pushino, Moscow District

Summary. Brief review of the laboratory methods development including measurement of serum cardiac biomarkers and evolution of myocardial infarction (MI) diagnostic criteria. Special attention is attracted to comparison of sensitivity and specificity of MB creatinphosphokinase and cardiac troponins in MI diagnosis. Brief review of modern international recommendations regarding MI diagnostic criteria is given including the WHO ones (1979) and general (universal) ones formulated in 2000, 2007 and 2012. Special attention is attracted to high sensitivity troponins measurement and problems regarding results interpretation. Brief review of principles and recommendations included into the last universal MI definition is given.

Key words: myocardial infarction, diagnostics, high sensitive troponin.

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

Первое международное определение ИМ, ВОЗ, 1979 г. ЭКГ и «сывороточные ферменты»

В 1979 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) предложила стандартизованное определение ИМ или, иначе говоря, стандартные диагностические критерии ИМ [1]. Причинами этой инициативы были: большая гетерогенность клинических симптомов, манифестируемых при поступлении пациентов с сердечной болью, и часто встречающаяся неопределенная картина на ЭКГ, не позволяющая однозначную интерпретацию.

Для решения этих проблем ВОЗ рекомендовала, что критериями *установленного* ИМ являются четкие (однозначно трактуемые) аномальные изменения на ЭКГ *и/или* четкое «изменение сывороточного фермента». Также рекомендовалось диагностическим критерием считать повышение «кардиоспецифических изоферментов», каких именно и в какой степени — не указывалось. Критериями *возможного* ИМ рекомендовалось считать

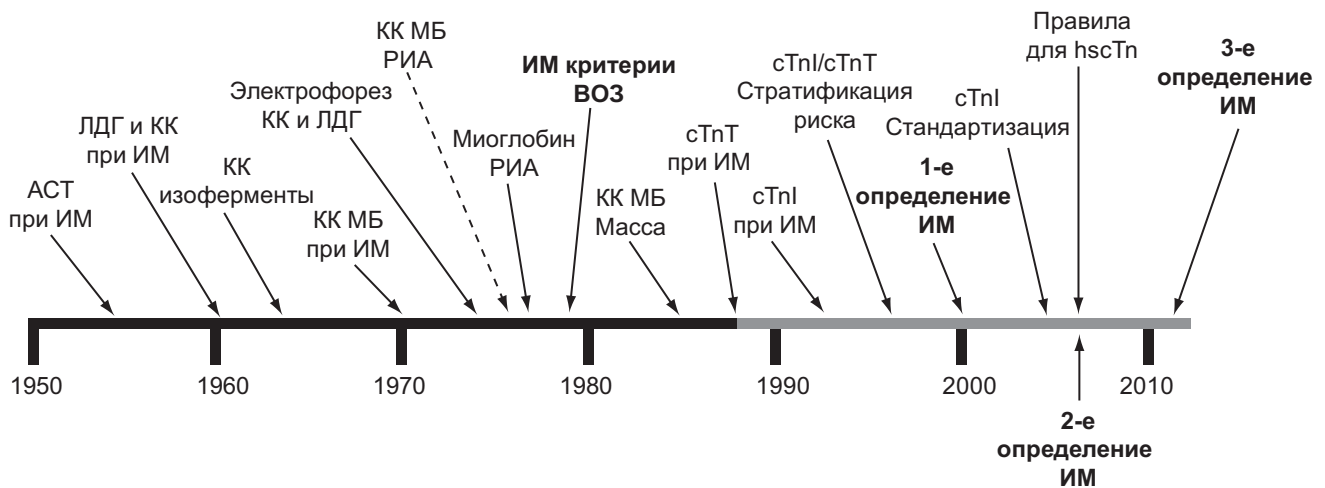


Рис. 1. Эволюция специфичности и чувствительности кардиомаркеров и международных критериев ИМ [2]. Подробности в тексте

наличие четких серийных изменений на ЭКГ, персистирующих более чем 24 ч «с или без» наличия четких изменений ферментов [1].

Таким образом, конкретных указаний, касающихся названий «сывороточных ферментов» и «кардиоспецифических изоферментов» и, тем более, их пограничных уровней, не было. Выбор был предоставлен врачам. И, как правило, он касался измерения общей активности КК, активности КК МБ, а позже — ее массы. Впоследствии оказалось, что ни активность, ни масса КК МБ не выявляют всех степеней тяжести миокардиального некроза, с помощью измерения КК МБ многие случаи ИМ оставались (и остаются) незамеченными. Дальнейшая эволюция кардиомаркеров, направленная на повышение их специфичности и чувствительности (рис. 1), привела к эволюции международных рекомендаций по диагностике ИМ, к принятию и эволюции *всеобщих* определений ИМ (universal definitions of MI).

Ключевым моментом в коэволюции кардиомаркеров и критериев ИМ стала разработка тестов на кардиальные тропонины, сначала теста на сТnТ, затем на сТnI (рис. 1). Первые исследования показали, что повышенные циркулирующие уровни сТnТ и сТnI действительно сильно связаны с повреждениями миокарда. В итоге, клиницисты быстро пришли к выводу, что тропонины имеют практически 100%-ю специфичность по отношению к ИМ. Более того, оказалось, что от 12% до 39% пациентов, поступивших с подозрением на ИМ, являются «отрицательными по массе КК МБ», но «положительными по тропонинам» [3].

Вызвано ли это «ложноположительным тропонином» или «ложноотрицательным КК МБ»? Мета-анализ многочисленных проспективных исследований показал, что «КК МБ отрицательные» и одновременно «сТn положительные» пациенты имеют высокий риск неблагоприятных исходов, притом даже в отсутствие повторных ишемических событий [4, 5]. Таким образом, стало оче-

видным, что повышенный тропонин — это не только маркер ИМ, но и показатель риска будущих неблагоприятных сердечно-сосудистых событий.

Тропонин — маркер для выявления любых повреждений миокарда: стратификация рисков, связанных с ССЗ

Эта концепция была разработана в начале 1990-х и основывалась на серийных измерениях тропонинов в первые 24 ч после поступления пациента с сердечной болью. Этот подход был направлен на оценку риска главных неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в течение последующих 30–60 дней и применялся только для пациентов с сердечной болью и с уже диагностированной нестабильной стенокардией или ИМ без элевации ST сегмента (ИМ Б ST) [6, 7].

В итоге, в 1999 г. американской Национальной академией клинической биохимии (National Academy of Clinical Biochemistry — NACB) были сформулированы рекомендации, в которых предлагалось измерять уровни тропонинов для выявления *любого* повреждения миокарда и устанавливались их пограничные уровни, оптимальные для диагностики острого коронарного синдрома (ОКС). При этом нижним пограничным уровнем для выявления повреждения миокарда устанавливалась концентрация тропонина, соответствующая его уровню, характерному для 97,5-й перцентили здоровой популяции [8]. Напомним, что чувствительность и специфичность диагностических наборов предусматривает, что верхний нормальный уровень аналита должен соответствовать таковому, характерному для 99-й перцентили нормальной популяции. 99-я перцентиль — это концентрация аналита, при которой 99 из 100 лиц здоровой популяции будут иметь отрицательный результат тестирования и только 1 из 100 может иметь ложноположительный результат. *Иначе говоря, концентрация 99-й перцентили — это верхний предел нормального уровня.*

Большое проспективное исследование (Thrombolysis in Myocardial Infarction — TIMI) подтвердило, что уровни тропонина, превышающие таковые для 97,5-й перцентили ($\geq 0,1$ нг/мл, сTnI Siemens), связаны с риском острых коронарных событий (ИМ, экстренная реваскуляризация, летальность), повышенным в 3–4 раза, по сравнению с таковым у лиц с тропонином ниже 97,5-й перцентили. Все это привело к рекомендации: пограничный уровень сTnI для выявления ОКС составляет 0,1 нг/мл, что было в 10 раз ниже того, что предлагалось ранее [9].

В целом, дальнейшие исследования показали, что на всем спектре тяжести ОКС концентрации тропонинов, даже слегка превышающие уровень 99-й перцентили, связаны с повышением риска неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [10], при этом *независимо от уровней КК МБ* [11].

В 2007 г. Национальная академия клинической биохимии США и Международная федерация клинической химии согласованно рекомендуют, что для сTnI, сTnT и ККМБ (масса) пограничный уровень для выявления повреждений миокарда, связанных с высоким риском острых коронарных событий, должен быть равен таковому для 99-й перцентили нормальной популяции, коэффициент вариации $CV \leq 10\%$ [12].

2000. Первое всеобщее определение ИМ: пограничное значение тропонинов

К концу девяностых международное сообщество кардиологов пришло к согласию, что *любая степень миокардиального некроза, вызванная ишемией, должна обозначаться как ИМ*. К этому времени накопились многочисленные данные, что именно тропонины — это наиболее чувствительные и специфические маркеры именно такого некроза. В итоге, в 2000 г. группа европейских и американских экспертов (Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee) сформулировала, как они его назвали, «простое и ориентированное как на ежедневную клиническую практику, так и на клинические исследования всеобщее (universal) определение ИМ» [13]. Согласно ему, термин ИМ должен был применяться только при наличии очевидных доказательств миокардиального некроза, связанного с ишемией миокарда и выявляемого с помощью функциональной диагностики (ЭКГ, коронарографии и др.). При этом «*индикатором миокардиального некроза являются: максимальные концентрации сTnT или сTnI, превышающие по крайней мере в течение первых 24 ч уровень, характерный для 99-й перцентили, по крайней мере, на одно ее значение*». Иначе говоря, пограничный уровень сTn для ИМ — это двукратное значение концентрации уровня 99-й перцентили (≥ 99 -я перцентиль $\times 2$). В случае, если измерение тропонинов было недоступным, рекомендовалось определение КК-МБ (масса), причем диагностическим в отношении ИМ также считался уровень « ≥ 99 -я перцентиль $\times 2$ ». Что же касается ИМ, связанного с чрез-

кожным коронарным вмешательством (далее — ИМ-ЧКВ), то рекомендовалось определение уровня кардио-маркеров до операции и через 6, 8 и 24 ч после нее. Конкретных рекомендаций, какая именно степень превышения уровня 99-й перцентили является диагностической в отношении ИМ-ЧКВ, не приводилось. Особо отмечалось, что хотя «биомаркеров, которые бы отличали повреждения, связанные с ОИМ, от повреждений миокарда, связанных с хирургической процедурой, нет, тем не менее, повышенные после кардиохирургической процедуры уровни биомаркеров связаны с большим повреждением миокарда, независимо от того, каков был механизм такого повреждения» [13].

Парадоксальность ситуации состояла в том, что в то время не было ни одного теста, чувствительность которого позволяла бы точно и надежно определять уровень тропонинов в нормальной популяции и устанавливать концентрации, характерные для 99-й перцентили: все здоровые люди были «тропонин-отрицательными». Тем не менее, повсеместно началось широкое измерение уровней тропонинов.

Что дало первое всеобщее определение ИМ

Во-первых, оно значительно повысило статистику диагнозов ИМ и, как результат, способствовало оказанию соответствующего лечения тем пациентам, которые ранее считались бы не имеющими ИМ, и вызвало многочисленные дискуссии о необходимости реклассификации маломасштабных миокардиальных некрозов уже как ИМ. Также были проведены специальные исследования, касающиеся того, как первое универсальное определение ИМ изменило статистику неблагоприятных исходов в кратко- [14, 15], средне- [15] и долгосрочном масштабах [16, 17].

Так, 493 пациента, поступившие с подозрением на ОКС между 1 мая 1999 и январем 2000 г., были разделены на 2 группы: А (224 пациента) — с повышенной КК МБ и/или с изменениями на ЭКГ, указывающими на ОИМ (критерии ВОЗ), и Б (51 пациент) — нормальная КК МБ, но повышенный сTnI. Смертность в течение 6 месяцев составила: 16,3% в группе Б против 5,8% в группе А. Таким образом, новые критерии ИМ выявляли большее количество пациентов с ИМ и высоким риском неблагоприятных исходов, которые с помощью критериев ВОЗ не выявлялись [14].

При анализе регистров, включавших наблюдение 26 267 пациентов, поступивших с подозрением на ОКС, было выявлено 15 760 (60%) больных с ОИМ, диагностированных с помощью, по крайней мере, одного кардио-маркера (преимущественно, активности КК МБ). Нестабильная стенокардия (при отсутствии повышения кардио-маркеров) была выявлена у 8549 (32,5%) лиц, остальные 1958 (7,5%) имели другие кардиальные или некардиальные диагнозы. Среди 10 719 пациентов, у которых проводилось измерение как КК МБ, так и тропонинов, было выявлено дополнительно 1110 (10,4%) па-

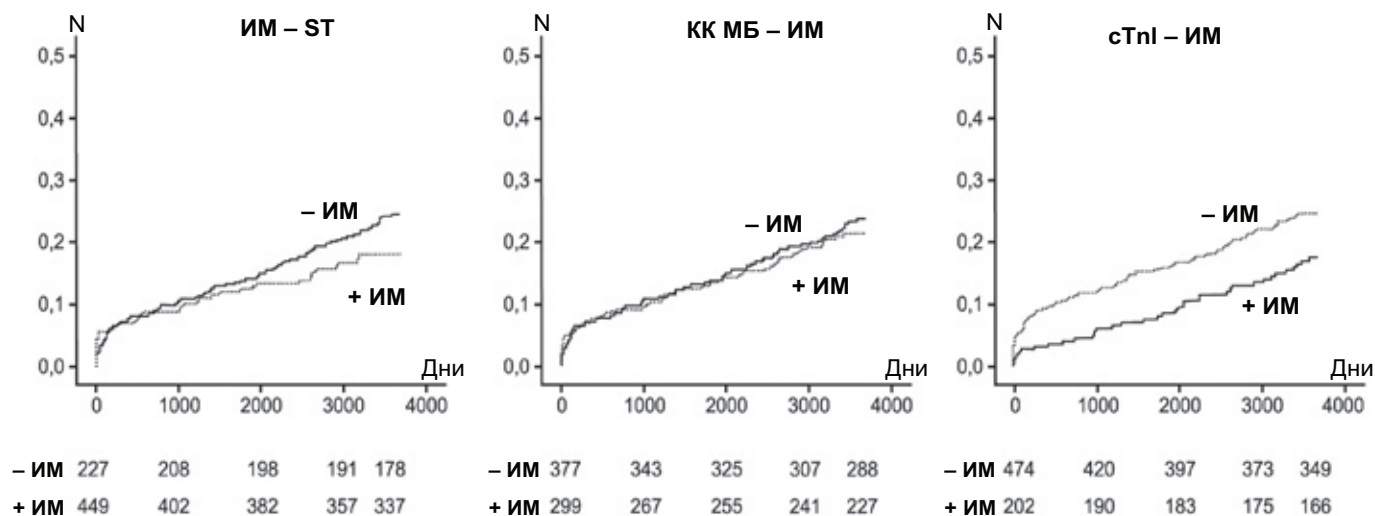


Рис. 2. Кумулятивная смертность в зависимости от диагностических критериев ИМ [18]. Подробности в тексте

циентов, диагностированных как имеющих ОИМ. Смертность в течение 6 месяцев составляла: у пациентов [ККМБ⁺ – сТn⁺] – 12,7%, [ККМБ⁻ – сТn⁺] – 8,4%, [ККМБ⁺ – сТn⁻] – 5,8% и [ККМБ⁻ – сТn⁻] – 5,3% [15].

Недавно опубликованы результаты исследования [18], направленного на выяснение того, к чему привело первое универсальное определение в течение 10 лет, прошедших со времени его широкого внедрения. Были изучены истории болезни 676 пациентов, поступивших между январем 1999 и декабрем 2000 г. с признаками ОКС. При поступлении проводились ЭКГ и измерения КК МБ и сТn, которые повторялись через каждые 6 ч в течение четырех дней. Диагностическими считались уровни КК МБ и сТnI (≥ 99 -я перцентиль $\times 2$) и наличие изменений на ЭКГ, характерных для ишемии. Риск общей смертности рассчитывался исходя из трех разных критериев ИМ, включавших: 1) типичные симптомы и персистенцию элевации ST сегмента или блокаду левой ножки пучка Гиса – «ИМ ST критерий»; 2) повышение КК МБ и типичные симптомы ишемии – «КК МБ критерий» и 3) повышение сТnI и типичные симптомы ишемии – «сТnI критерий». Общая смертность за 10 лет составила 23,8%. При этом по группам пациентов десятилетняя смертность составляла: 1) согласно «ИМ ST критерию» – 33,6%, 2) согласно «КК МБ критерию» – 55,8%; 3) согласно «сТnI критерию» – 70,1%. Отношение рисков смертности в течение 10 лет в зависимости от наличия/отсутствия ИМ составило: 1) при «ИМ ST критерии» – 0,46–1,08; 2) «при КК МБ ИМ» критерии – 0,84, 3) при «сТnI ИМ критерии» – 1,58. Пациенты, направленные на реваскуляризацию на ранних стадиях пребывания в госпитале, имели значительно сниженную смертность по сравнению с теми, у кого реваскуляризация проведена не была.

Чем же отличались пациенты, у которых ИМ выявлен согласно сТnI, от всех остальных? Они были моложе,

чаще курили, имели более высокое диастолическое давление и большую частоту сердечных сокращений, большее количество предшествовавших случаев сердечной недостаточности, ишемические изменения на ЭКГ, более низкое количество предшествовавших случаев ЧКВ и в целом повышенные значения риска по шкале GRACE. При поступлении у таких пациентов фракция выброса более часто составляла 40%.

Принципиально, что пациенты, у которых ИМ был диагностирован согласно первому всеобщему определению, на начальных стадиях терапии более часто получали тиенопиридины (thienopyridines), гликопротеиновые ингибиторы Пб/Ша и ингибиторы ренин-ангиотензиновой системы.

Также принципиально, что именно тем пациентам, у которых ИМ был диагностирован согласно первому всеобщему определению, более часто назначались коронарная ангиография и ЧКВ и реже коронарная хирургия. Динамика кумулятивной смертности в течение 10 лет в зависимости от критериев диагноза ИМ представлена на рисунке 2. Видно, что смертность у пациентов, диагностированных согласно критериям «ИМ ST» и «ИМ КК МБ», практически не отличалась в случаях, когда ИМ был диагностирован и когда не был. Полагается, что при указанных критериях диагностики значительное количество пациентов с реальными ИМ остается не выявленными и не получившими необходимой помощи, что приводит к повышению их смертности. Напротив, диагностика с помощью тропонинов приводит к выявлению большего количества случаев ИМ и, в итоге, к снижению смертности у пациентов, у которых ИМ с помощью измерения уровней тропонинов диагностирован не был. В целом, авторы считают, 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 по-

пуляции с широким спектром ОКС первое универсальное определение ИМ повышает количество диагнозов ИМ на 25% и является независимым предиктором смертности в течение 10 лет. Проведение более частой реваскуляризации связано со значительным снижением смертности» [18].

2007. Второе всеобщее определение ИМ: тропонины в динамике

Оно было сформулировано объединенной рабочей группой экспертов Европейского общества кардиологов, Американского колледжа кардиологии, Американской ассоциации сердца и Всемирной кардиологической федерации (Global Task Force on Myocardial Infarction) [19], которая предложила, в частности, следующую классификацию различных типов ИМ:

- тип 1. Спонтанный ИМ, связанный с ишемией вследствие первичного коронарного события (эрозия и/или разрушение, растрескивание или расслоение бляшки);
- тип 2. Вторичный ИМ, связанный с ишемией, вызванной недостатком кислорода, например, при коронарном спазме, коронарной эмболии, анемии, аритмии, гипер- или гипотензии;
- 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;
- тип 4а. ИМ, ассоциированный с ЧКВ (ИМ-ЧКВ);
- тип 4б. ИМ, связанный с тромбозом стента, подтвержденным ангиографией или на аутопсии;
- тип 5. ИМ, ассоциированный с аортокоронарным шунтированием.

В качестве диагностического критерия ИМ типов 1 и 2 рекомендовалось:

- **повышение или снижение** уровня кардиальных маркеров (предпочтительно — тропонинов), по крайней мере, на одно значение, характерное для 99-й перцентили ($\geq 2 \times 99$ -я перцентиль»),
- **одновременно с наличием, по крайней мере, одного из следующих признаков:** 1) симптомов ишемии, 2) изменений ЭКГ, указывающих на вновь развившуюся ишемию, 3) появления патологического зубца Q, 4) дополнительной гибели миокарда или регионального нарушения подвижности сердечной стенки, доказанных путем визуализации (имиджинга) [19]. Также второе всеобщее определение ИМ устанавливало, что диагностическими уровнями тропонинов являются:
 - для ИМ, связанного с ЧКВ (тип 4а), — *трехкратное* превышение уровня 99-й перцентили (≥ 99 -я перцентиль $\times 3$);

— для ИМ, связанного с аортокоронарным шунтированием (АКШ), — *пятикратное* (≥ 99 -я перцентиль $\times 5$).

Проф. Kristian Thygesen — сопредседатель группы экспертов, разрабатывавших второе всеобщее определение ИМ, отмечал, что против второго определения возникла серьезная оппозиция, в особенности со стороны «специалистов интервенционной кардиологии и кардиохирургов, которые не хотели воспринимать ИМ как осложнение, связанное с ЧКВ и с кардиохирургическим вмешательством. Это указывало на их желание сделать пограничные уровни тропонинов как можно более высокими. Консенсус был труднодостижим, так как провести клинические испытания, которые бы дали решение этой проблемы, было невозможно» [20].

В целом, второе универсальное определение ИМ рекомендовало, что предпочтительным диагностическим маркером должен быть тропонин, что его измерение должно иметь приемлемую аналитическую точность, при уровне, соответствующем 99-й перцентили, CV должно быть $\leq 10\%$. На момент публикации второго определения все еще не было ни одного коммерческого теста, который бы соответствовал этим требованиям, а все доступные имели низкую чувствительность и большой разброс результатов (CV = 20–35%).

Важным нововведением в документе 2007 г. было *необходимое условие повышения или снижения* уровней кардиомаркеров (предпочтительно тропонинов), что согласовывалось с практически одновременно опубликованными Правилами Национальной академии клинической химии США [21]. Именно это нововведение послужило *«мандатом для проведения серийных измерений тропонина у всех пациентов с подозреваемым или имеющимся спонтанным ИМ типа 1»* [22].

При этом второе определение ИМ не указывало конкретных количественных показателей повышения или падения уровней тропонинов. Однако в правилах Национальной академии клинической химии США в качестве диагностического рекомендовалось изменение динамики уровней тропонина на 20% в течение 3 и 6 ч после первого измерения [21]. В целом, оба документа рекомендовали измерения тропонинов проводить при поступлении, затем примерно через 6 и 9 ч и снова через 12 и 24 ч [19, 21].

Что касается тестов Point-of-Care (ПОСТ), большинство из которых в лучшем случае являются полуквалификационными, они рекомендовались только для скрининга.

Весьма показательными оказались результаты применения критериев второго определения ИМ к диагностике ИМ-ЧКВ. Как указывалось, согласно второму определению ИМ-ЧКВ диагностировался как повышение тропонина ≥ 99 -я перцентиль $\times 3$. Мета-анализ 15 исследований, включавших 7578 пациентов, перенесших ЧКВ, показал, что у 28,7% из них было пост-операционное повышение тропонина, при этом ИМ-ЧКВ был диа-

гностирован у 14,5% больных. При этом, чем сильнее был повышен тропонин, тем выше был риск неблагоприятных исходов в течение 18 месяцев (повторная реваскуляризация, АКШ, повторный ИМ, смерть). Авторы сделали вывод: «измерение тропонинов после ЧКВ должно быть обязательным» [16].

Главная причина появления третьего всеобщего определения ИМ — разработка высокочувствительного метода измерения концентрации кардиальных тропонинов (hs cTn — high sensitive cardiac troponin — высокочувствительный кардиальный тропонин, англ.).

Высокочувствительные тропонины: новые возможности

Именно высокочувствительные тропонины решили «проблему 99-й перцентили», но, как это обычно бывает, создали новые и совершенно неожиданные. «Тропонин-отрицательных» не стало: оказалось, что средние нормальные уровни hs cTn составляют 2–5 нг/л, а уровни 99-й перцентили — 14–20 нг/л (в зависимости от конкретного hs-теста), см. обзоры [23–26].

Высокочувствительное определение тропонина основано на использовании моноклональных антител, «узнающих» его различные эпитопы (их может быть весьма много). Производители hs cTn тестов для повышения чувствительности используют для одного диагностического набора все большее количество различных антител. В результате тесты различных производителей имеют: а) разные показатели чувствительности (нижний предел определения), разные значения 99-й перцентили и разные значения диагностических уровней. «Сравнение абсолютных концентраций тропонинов, полученных с помощью тестов различных производителей, невозможно» [24, 27].

Высокочувствительные cTn тесты классифицируются по степени их чувствительности, т. е. по проценту лиц нормальной популяции, у которых определяется концентрация cTn *ниже* верхнего нормального уровня (99-й перцентили). Тест уровня 1 (или «современный», *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 от 75 до 95%. Тесты четвертого уровня (третье поколение hs тестов) — у 95% «здоровых» лиц [28].

Многочисленные исследования показали, что вместо четкого пограничного уровня тропонина, характерного для ИМ, появилась плавная шкала его повышенных концентраций, отражающая сначала субклиническую патологию миокарда, связанную с его структурными (неишемическими) повреждениями, затем стабильные заболевания коронарных артерий, потом нестабильную стенокардию и, наконец, ИМ без элевации ST-сегмента. Более того, оказалось, что существует большое количество патологий, не связанных с ишемией миокарда, но ассоциированных с повышенными уровнями hs cTn [23–26].

Проспективные исследования показали, что в общей популяции до 2% здоровых лиц имеют значения hs cTn > 99-й перцентили. Впоследствии у таких лиц обнаруживались стабильные заболевания коронарных артерий, сердечная и почечная недостаточность, гипертрофия левого желудочка, либо комбинации этих патологий, в целом не связанных с ишемическим высвобождением тропонинов из миокарда [29–32]. В итоге, были сделаны следующие обобщения:

- повышение hs cTn > 99-й перцентили характерно для пациентов со структурной патологией миокарда, включая стабильные заболевания коронарных артерий [33];
- *при стабильной сердечной недостаточности* медиана концентрации hs cTnT равна 12 нг/л, что очень близко к значению 99-й перцентили — 14 нг/л (hs cTnT Roche) [34];
- при подозреваемой *стабильной стенокардии* уровень hs cTn выше 99-й перцентили обнаруживается у 37% пациентов с бляшками в коронарных артериях [33, 35];
- высокочувствительные тропонины могут быть повышены как у нормотензивных [36], так и у гипертензивных пациентов с острой эмболией легочной артерии [37].

И, главное, любые повышения hs cTn, независимо от их причины, все равно являются предикторами неблагоприятных исходов [23–26].

Таким образом, еще раз стало ясным: плата за высокую чувствительность — снижение специфичности, повышение hs cTn может быть связано со структурными повреждениями миокарда, связанными, в свою очередь, с большим количеством различных, не ишемических причин. Ключ к повышению специфичности hs cTn — серийные измерения при наличии симптомов, указывающих на ОКС (сердечная боль). Если повышенный при первом измерении уровень hs cTn вызван: стабильными заболеваниями коронарных артерий; хронической сердечной недостаточностью; нестабильной стенокардией и др. не ишемическими причинами, то при серийных измерениях уровни hs cTn повышаться *не* должны. При *серийных* измерениях повышение уровня hs cTn (> 99-й перцентили) *четко указывает на ИМ Б ST* [23–26].

Как же пользоваться высокочувствительными тестами? Не слишком ли они сложны для интерпретации? Первая международная согласованная рекомендация по высокочувствительному измерению тропонинов была предложена экспертами Европейского кардиологического общества (Group on Biomarkers in Cardiology of the ESC Working Group on Acute Cardiac Care) в 2010 г. [38]. В результате, во многих европейских кардиологических центрах высокочувствительное измерение кардиальных тропонинов (параллельно с измерением «обычных») стало проводиться в рамках рутинной клинической практики [39]. Все эти многоцентровые исследования привели к двум важнейшим результатам:

- высокочувствительные тесты выявляют большее количество случаев ИМ Б ST, чем «обычные». В итоге, значительное количество пациентов, у которых на основании «обычных» сTn тестов диагностировалась нестабильная стенокардия, с помощью высокочувствительных были отнесены к группе с ИМ Б ST. При этом диагностика была более ранней — в течение первых 3–6 ч, что при применении адекватных лечебных мероприятий давало значительное уменьшение числа неблагоприятных исходов по сравнению с предшествовавшей ситуацией (диагностика с помощью обычных тропонинов);
- для диагностики ИМ с помощью высокочувствительных тропонинов следует принимать во внимание не только «одноразовые» абсолютные значения их концентрации, но и определять динамику их изменения (дельту) [40, 41], что, впрочем, было рекомендовано и для обычных тропонинов [19].

Все эти данные требовали четких рекомендаций по интерпретации высокочувствительного измерения тропонинов. Тем более, что первый опыт их массового внедрения в клиническую практику привел к весьма впечатляющим результатам.

Чем ниже пограничный уровень — тем больше выявленных инфарктов

Рассмотрим в этой связи результаты двух проспективных исследований, направленных на выяснение клинических последствий снижений пограничных уровней сTn. В первой фазе исследования [43], в период с 1 февраля по 31 июля 2008 г., наблюдали 1038 пациентов, поступивших с признаками ОКС. Измеряли сTnI (тест Abbott Architect, 99-я перцентиль — 0,012 нг/мл, CV = 20,8%). Пограничным уровнем для миокардиального некроза считали > 0,20 нг/мл. Во второй фазе (с 1 февраля по 31 июля 2009 г.) пограничный уровень снизили в 4 раза — > 0,05 нг/мл, CV = 7,2%. Согласно уровням сTnI (нг/мл) при поступлении все пациенты были разделены на три группы: 1) < 0,05, 2) 0,05–0,19 и 3) ≥ 0,20 нг/мл. В течение одного года фиксировались неблагоприятные исходы: повторные ИМ и кардиоваскулярная смерть. В первой фазе исследования (обычный тропонин, пограничный уровень — 0,2 нг/мл) повторные ИМ или смерть были зафиксированы: 1) у 7% пациентов с сTnI < 0,05; 2) у 39% пациентов с сTnI от 0,05 до 0,19 (уровни меньше пограничного), 3) у 24% пациентов с сTnI > 0,20 нг/мл. Во второй фазе (hs сTnI, пограничный уровень — 0,05 нг/мл, CV = 7,2%) ИМ или смерть были зафиксированы: 1) у 5% пациентов с hs сTnI < 0,05; 2) у 21% пациентов с hs сTnI в пределах 0,05–0,19, 3) у 24% пациентов с hs сTnI > 0,20. Наибольший положительный клинический эффект, выразившийся в снижении повторных ИМ и смертности с 39% до 21%, понижение пограничного уровня hs сTnI имело для пациентов с уровнями сTnI, которые ранее считались ниже пограничных. В целом, *снижение пограничного*

уровня сTnI в четыре раза привело к снижению количества повторных ИМ в 2,6 раза и смертности в 1,9 раза (наблюдение 1 год) [43].

А если снизить пограничный уровень для диагностики ИМ до значения 99-й перцентили? В следующем проспективном исследовании [44] пограничным для ИМ считали прежний уровень > 0,05 нг/л. Однако в течение года регистрировали исходы и у пациентов, у которых при поступлении hs сTnI был 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 со всеми вытекающими последствиями. Наблюдались 2092 пациента, имевших при поступлении с признаками ОКС следующие уровни hs сTnI (нг/мл): < 0,012 — 988 пациентов (47%); 0,012–0,049 — 352 (17%); > 0,050 — 752 (36%). В течение одного года риск неблагоприятных исходов (повторные ИМ, летальность) составлял: у пациентов с hs сTnI < 99-й перцентили (< 0,012) — 3%, при > 0,012–0,049 — 13% (уровни выше 99-й перцентили и ниже пограничного). Отношение рисков неблагоприятных исходов для пациентов с hs сTnI < 99-й перцентили и у пациентов с hs сTnI > 99-й < 0,05 составило 4,7. В целом, «снижение диагностического уровня до 99-й перцентили повышает количество выявленных пациентов с высоким риском неблагоприятных исходов и повышает количество диагностируемых ИМ на 47%» [44].

Таким образом, замена КК МБ на обычные тропонины повысила количество ИМ на 25%, а замена обычных тропонинов на высокочувствительные — еще почти на 50%.

2012. Третье всеобщее определение ИМ: высокочувствительные тропонины в динамике

Этот документ разработан Европейским обществом кардиологии, Американским колледжем кардиологии, Американской ассоциацией сердца и Всемирной федерацией сердца [45]. Принципиально, что текущее всеобщее определение ИМ направлено не столько на установление конкретных пограничных уровней тропонинов для диагностики ИМ, сколько на наиболее раннее выявление повреждений миокарда при симптомах ишемии [45].

Третье всеобщее определение ИМ [45] устанавливает, что:

- предпочтительными маркерами для диагностики ИМ являются сTnT или сTnI;
- значения концентраций сTn должны выражаться в нг/л или пг/мл;
- повышенная концентрация сTn — это уровень, превышающий таковой для 99-й перцентили (только hs сTn тесты способны определять в здоровой популяции уровни тропонинов для 99-й перцентили);
- конкретные значения концентрации тропонина, характерные для 99-й перцентили, установленные производителем, включая таковые для многих высокочувствительных тестов, могут быть найдены в инструкциях к тестам или в недавних публикациях;

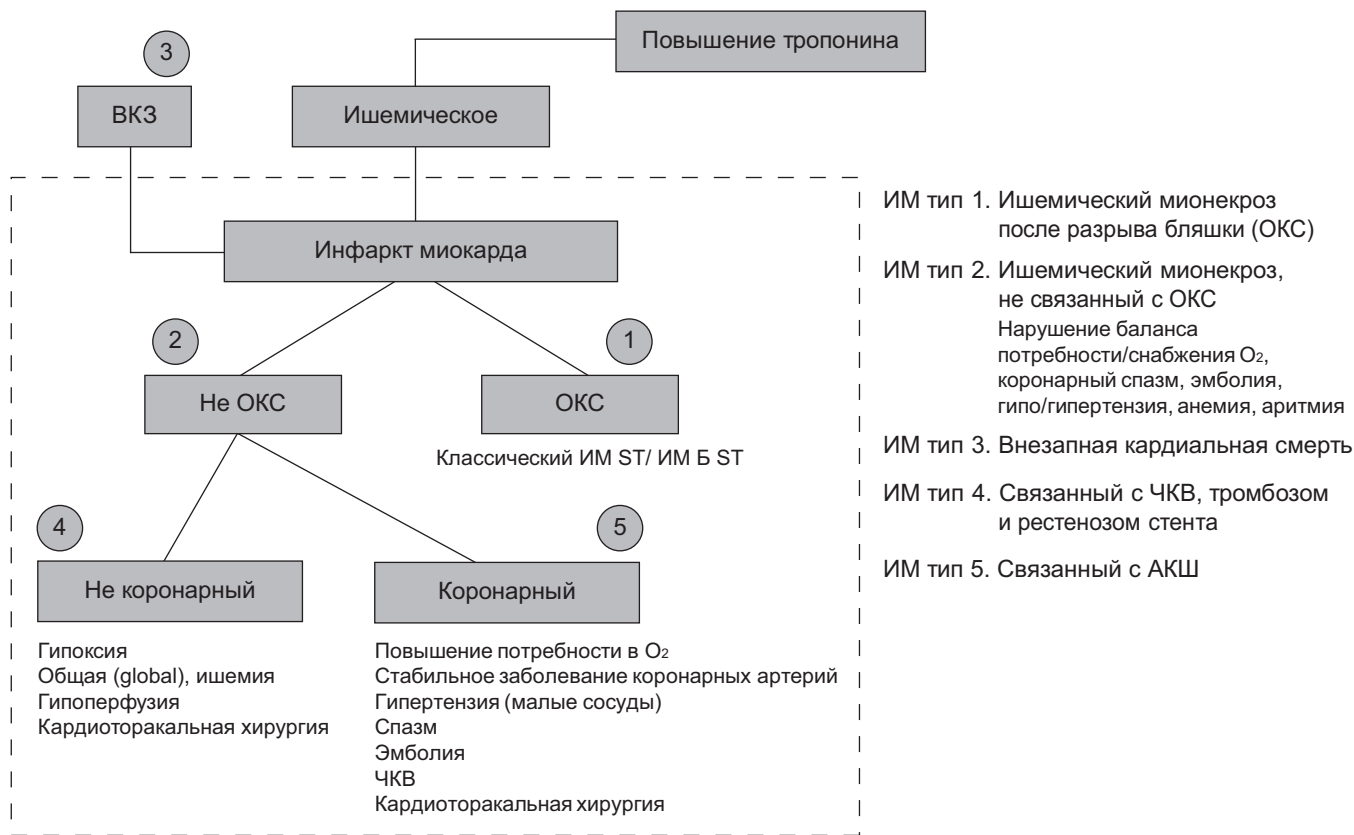


Рис. 3. Типы ИМ и их патофизиологические характеристики [45, 46]

- повышение или снижение концентрации тропонина по отношению к уровню 99-й перцентили существенно для диагноза ОИМ;
- дискриминирующее значение 99-й перцентили, необходимое для принятия решения о постановке или исключении диагноза ИМ, должно быть определено в каждой лаборатории для каждого специфического теста (с соответствующим контролем качества);
- количественные критерии повышения сТп зависят от конкретного теста и могут быть установлены на основании профиля точности каждого индивидуального теста, включая hs сТп тесты;
- оптимальное значение CV при 99-й перцентили — 10%;
- использование тестов, не имеющих при 99-й перцентили CV = < 10%, делает определение значимых изменений тропонина уровней более трудным (поздним), но не приводит к ложноположительным результатам;
- тесты с CV > 20% при 99-й перцентили использоваться не должны [45].

Другие кардиомаркеры. В случаях, когда измерение сТп недоступно, рекомендуется измерение КК МБ (масса). Другие кардиомаркеры (включая активность общей КК, активность КК МБ, АЛТ, АСТ и др.) для диагностики ИМ применяться не должны и имеют в на-

стоящее время только историческое значение [45]. (Миоглобин в новом определении ИМ не упоминается. — прим. авт.).

Весьма важными также являются и недавно опубликованные согласованные рекомендации по интерпретации повышенных тропонинов, сформулированные американскими экспертами [46].

Согласно текущим рекомендациям, современный диагноз ИМ ограничивается специфическим клиническим состоянием, в котором миоциты повреждены ишемией из-за разрыва бляшки (ИМ тип 1), или ишемией другой этиологии (ИМ тип 2) или региональным или полным повреждением миокарда, связанным с реваскуляризацией (типы 4а и 5) [45, 46].

Полагается, что «ИМ не является синонимом ОКС (под ОКС следует понимать последствия разрыва бляшка и тромбоза). Таким образом, ишемия, вызванная стабильными повреждениями миокарда или повышенной потребностью в кислороде хотя и может быть причиной ИМ типа 2, но не считается вызванной ОКС. *Повышенный тропонин не является признаком ИМ, скорее это чувствительный и специфичный показатель миокардиального некроза, неспецифический по отношению к этиологии такого некроза*» [46].

Третье всеобщее определение ИМ рекомендует разные алгоритмы диагностики в зависимости от их типов (рис. 3).

Главное в диагностике ИМ типов 1 и 2 — **«выявление повышения и/или снижения концентрации кардио-маркера [предпочтительно кардиального тропонина (сТн)], по крайней мере, на одно значение 99-й перцентили, соответствующей верхней границе референтного уровня»**, т. е. « ≥ 99 -я перцентиль $\times 2$ », как и во втором определении.

Дополнительно должен иметь место, по крайней мере, **один из пяти подтверждающих признаков ИМ:**

- симптомы ишемии,
- новое (или предположительно новое) значительное изменение сегмента ST и зубца T, или блокада левой ножки пучка Гиса,
- появление патологического зубца Q,
- дополнительная гибель миокарда или региональное нарушение подвижности миокарда, доказанные путем визуализации (имаджинга),
- обнаружение внутрикoronарного тромба при ангиографии или на аутопсии (это новый, по сравнению с предыдущим определением ИМ, признак).

«В высшей степени важно (extremely important) не только отличить ИМ типа 1 от ИМ типа 2, но и установить причины, связанные с неишемическими повышениями тропонинов, которые могут иметь как кардиальную, так и системную этиологию.

Миокардиальный некроз — это лабораторный диагноз, который не указывает на этиологию некроза, тогда как ИМ — это клинический диагноз.

Всем практикующим врачам для выработки решения о начале соответствующей терапии важно полностью понимать причину и значение повышенного тропонина у данного конкретного пациента» [46].

Периоперационные ИМ

Многочисленные исследования установили, что повышенные постоперационные уровни тропонинов связаны с повышенным риском неблагоприятных исходов, включая летальный исход и ИМ. Об этом, в частности, свидетельствует мета-анализ исследований, выполненных с применением «старых», менее чувствительных тестов [16].

Согласно третьему всеобщему определению ИМ, **ИМ, связанный с ЧКВ** (тип 4а), диагностируется:

- у пациентов с нормальным исходным уровнем сТн — при превышении его уровня 99-й перцентили в течение 48 ч после процедуры в **пять раз** (> 99 -я перцентиль $\times 5$),
- у пациентов с исходно повышенным сТн (стабильным или снижающимся) — при повышении исходного уровня сТн более чем на 20% **при дополнительном наличии**, по крайней мере, одного из следующих признаков, включающих:
 - симптомы миокардиальной ишемии,
 - вновь появившиеся признаки ишемии на ЭКГ,
 - осложнения, связанные с чрезкожной процедурой (по результатам ангиографии),

- гибель дополнительной части миокарда или региональное нарушение подвижности миокарда, доказанные путем визуализации (имиджинга) [45].

Существенно, что при применении «обычных» тропонинов было показано, что у 20% пациентов, перенесших ангиографически неосложненные ЧКВ, они значительно повышены [47]. Напомним, что второе определение рекомендовало диагностировать ИМ, связанный с ЧКВ, при более чем 3-кратном превышении 99-й перцентили сТн [19]. Как показали специальные исследования, в такой ситуации у $\geq 15\%$ пациентов, перенесших ЧКВ, констатировался ИМ [16, 48, 49]. В целом, третье определение одновременно «повысило» и чувствительность тропониновых тестов и диагностический порог их уровней, характерный для диагностики ИМ-ЧКВ.

Таким образом, сейчас пятикратное повышение постоперационных уровней считается диагностическим критерием для ИМ, связанного с ЧКВ.

Однако, что касается риска развития ИМ после ЧКВ, то наиболее прогностическими считаются предоперационные уровни тропонинов [46]. Так, при наблюдении 2352 пациентов, перенесших плановое или неотложное ЧКВ, было показано, что повышенные именно предоперационные, но не послеоперационные, уровни тропонинов прогнозировали долгосрочные неблагоприятные исходы [50]. Сходные результаты были получены и при наблюдении 5847 пациентов, перенесших плановое ЧКВ [51]. Однако в раннем исследовании было показано, что послеоперационный тропонин оставался прогностически значимым даже после поправки на повышенные уровни предоперационного тропонина [52]. Таким образом, повышенные предоперационные уровни тропонина могут быть прогностическими для исходов ЧКВ, а послеоперационные (> 99 -я перцентиль $\times 5$) — диагностическими для ИМ-ЧКВ. Мета-анализ исследований, в которых применялись более чувствительные сТн тесты, показал, что периоперационное повышение тропонина может иметь особенно важное прогностическое значение в тех случаях, когда произошедшие интрапроцедурные осложнения вызвали нарушения кровотока, зарегистрированные с помощью ангиографии.

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 сТн (> 99 -я перцентиль $\times 2$).

ИМ, связанный с рестенозом после ЧКВ (тип 4с), диагностируется:

- при наличии $\geq 50\%$ стенозов при коронарной ангиографии,
- либо как комплексное поражение, ассоциированное с ростом и/или падением уровня сТн > 99 -й перцентили **при отсутствии** значительной обструкции коронарных артерий после:
 - а) первоначально удачной постановки стента, или

б) баллонной ангиопластики стенозированной коронарной артерии (< 50%).

Согласно специальным исследованиям, рестеноз, развивающийся после ЧКВ, в будущем ведет к ИМ у 10% пациентов [54].

ИМ, связанный с АКШ (тип 5), у пациентов с нормальным исходным сТп диагностируется при повышении в течение 48 ч после операции уровня сТп, превышающего 99-ю перцентиль в *десять раз* (> 99-я перцентиль × 10), *при одновременном наличии*, по крайней мере, одного из дополнительных критериев, включающих:

- появление патологического зубца Q или блокаду левой ножки пучка Гиса,
- ангиографически подтвержденную окклюзию нового шунта или исходной коронарной артерии,
- гибель участка миокарда или региональное нарушение подвижности миокарда, доказанное путем визуализации (имаджинга).

Напомним, что второе универсальное определение трактовало ИМ, связанный с АКШ, как более чем пятикратное превышение 99-й перцентили сТп [19].

В целом, в третьем всеобщем определении ИМ по сравнению со вторым для ИМ-ЧКВ пограничный уровень тропонина (теперь уже высокочувствительного) повышен в 1,6 раза, а для диагностики ИМ-АКШ — в 2 раза [19, 45].

Третье всеобщее определение ИМ вводит два новых типа ИМ.

Реинфаркт — это ОИМ, развившийся в течение 28 дней после первого или повторного эпизода ИМ. У таких пациентов можно не определять КК-МВ, но рекомендуется серийное измерение сТп, при этом повышение его уровня ≥ 20% подтверждает развитие реинфаркта [45].

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 рекомендуются 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 [45].

Диагностика ИМ при других кардиальных процедурах

У пациентов, подвергающихся кардиохирургии, часто наблюдаются новые аномалии S-T сегмента. ИМ 1 или ИМ 2 могут полагаться установленными в случаях:

- когда появляются новые патологические волны Q, свидетельствующие о повреждении зон миокарда,

помимо тех, которые были определены до хирургического вмешательства и в особенности,

- если это связано с повышением уровней кардиомаркеров и
- с аномалиями движения стенки или с гемодинамической нестабильностью [46].

Такие процедуры, как транскатетерная имплантация аортального или митрального клапана, могут приводить к повреждению миокарда, как за счет прямого травмирования миокарда, так и за счет коронарной обструкции или эмболизации. Полагается, что в этих случаях, так же, как и при АКШ, чем сильнее повышены уровни биомаркера, тем хуже прогноз, однако фактической информации, подтверждающей это, пока нет. Поэтому новое определение ИМ предлагает для диагностики перипроцедурного ИМ применять те же самые критерии, которые рекомендуются для диагностики ИМ, связанного с АКШ [45].

Абляция и аритмия могут быть связаны с контролируемым повреждением миокарда, с применением методов нагревания или охлаждения тканей. Тяжесть таких повреждений, связанных с некрозом, может быть определена с помощью измерения тропонина, но в этом контексте повышение тропонина не должно означать диагноз ИМ [45].

ИМ, связанные с некардиальными хирургическими вмешательствами

Периоперационный ИМ — это наиболее частое сосудистое осложнение при главных некардиальных хирургических вмешательствах, связанное с неблагоприятными прогнозами. Пациенты с периоперационными ИМ не испытывают ишемических симптомов, однако такие асимптоматические ИМ, так же как и ИМ с симптомами, имеют сильную связь с 30-дневной летальностью. В специальном исследовании у 325 пациентов, перенесших некардиальную хирургию, показано, что 45% из них имели уровень hs TnT, превышающий таковой для 99-й перцентили, и 22% имели динамику hs сТпТ, указывавшую на развивающийся миокардиальный некроз [55]. Полагается, что большинство ИМ, связанных с главными некардиальными хирургическими вмешательствами, преимущественно вызваны нарушением баланса потребности и снабжения O₂ на фоне заболевания коронарных артерий и тем самым указывают на ИМ 2 типа. Поэтому у пациентов с высоким риском рекомендуется рутинный мониторинг маркеров как перед операцией, так и в течение 48–72 ч после нее [46].

Повреждение миокарда или ИМ, связанные с сердечной недостаточностью

Следует ли измерять тропонины, тем более, высокочувствительные, у пациентов с СН? Мета-анализ 16 исследований показал, что у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) повышенные тро-

понины связаны с повышенным риском смертности, составлявшим 2,85, и с повышенным риском главных неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, составлявшим 2,38 [56]. Согласно международным рекомендациям, при начальном обследовании пациентов с подозреваемой или доказанной СН следует исключить наличие ИМ [57, 58].

В целом, повышение hs cTn, характерное для миокардиального некроза, наблюдается почти у всех пациентов с СН, особенно у лиц с острой декомпенсированной СН (ОДСН). 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 [59]. Насколько оправдано определение именно hs cTn у пациентов с ОДСН?

У 202 пациентов, поступивших с ОДСН и не имевших признаков ИМ, измеряли как обычный, так и высокочувствительный cTnT. Измеряемые уровни cTnT обнаруживались у 56% пациентов, а hs cTnT — у 98%. 81% пациентов имели уровни hs cTnT выше 99-й перцентили. Оба тропониновых теста предсказывали риск смерти (наблюдение в течение 406 дней, медианное значение), при этом значения AUC ROC для cTnT и hs cTnT составляли 0,67 против 0,71. Однако у пациентов с cTnT < 0,03 нг/мл, но > hs cTnT выше 20 пг/мл, был выявлен высокий риск смерти (отношение рисков 4,7). Полагается, что у пациентов с ОДСН как «обычный», так и высокочувствительный тропонины дают сходную прогностическую информацию, однако у пациентов с низкими уровнями cTnT прогностическую информацию может дать только hs cTnT [60].

В общем, согласно согласованным рекомендациям [45, 46, 59]:

при ХСН:

- измерение тропонина может применяться с целью прогнозирования;
- у пациентов с СН с сохраненным или не сохраненным объемом выброса повышенные тропонины имеют прогностическое значение для оценки риска смертности или госпитализации;
- уровни тропонина, превышающие 99-ю перцентиль, связаны с высокой вероятностью неблагоприятного исхода;
- при СН причины повышения cTn выше 99-й перцентили могут быть разными и вызванными как коронарными, так и не коронарными механизмами;
- хотя повышенные тропонины имеют при СН прогностическое значение, они не являются маркерами, дифференцирующими ишемическую или неишемическую этиологию СН;
- данные о наличии специфических интервенционистских мероприятий, благоприятных для пациентов с ХСН и тропонинами выше 99-й перцентили, неизвестны;

при ОСН:

- при поступлении пациентов с признаками ОСН тропонин должен быть срочно измерен для быстрого подтверждения или исключения ИМ типа 1;
- повышенные тропонины всегда должны интерпретироваться с большим подозрением на ИМ типа 1, особенно в контексте наличия: а) повышения или снижения этого маркера, б) типичных симптомов ишемии при неинвазивном тестировании или при, в) очевидной новой утрате функции миокарда;
- текущее всеобщее определение ИМ предусматривает, что одно только повышение тропонинов, без наличия особо оговариваемых дополнительных признаков ИМ, не достаточно для выявления диагноза ИМ, или типа ИМ, или этиологии повышения тропонинов при СН;
- при ОСН тропонин, превышающий уровень 99-й перцентили, связан с высокой вероятностью неблагоприятного исхода, более высокие концентрации тропонина связаны с более неблагоприятным исходом;
- у госпитализированных пациентов в острых случаях уровни cTn могут повышаться и при лечении снижаться;
- паттерны высвобождения тропонина в циркуляцию не могут применяться для заключения об их коронарном или некоронарном механизме и никаких предположений о наличии или отсутствии ОКС на основании этих паттернов делать не следует;
- несмотря на наличие подходящих методов лечения ИМ типа 1, данных о наличии специфического интервенционистского вмешательства при ОСН и при уровнях тропонина, превышающих 99-ю перцентиль, нет [45, 46, 59].

В целом, при СН повышение тропонина следует рассматривать как независимый предиктор неблагоприятных исходов как при ХСН, так и при ОСН, вне зависимости от механизма повышения этого маркера. Повышенные уровни тропонина при СН не являются «ложноположительными». Более того, если при СН и при серийных измерениях уровни тропонина повышаются — это должно рассматриваться как основание для серьезного подозрения на развивающийся ИМ [59].

Миокардиты и миоперикардиты

Считается, что эти две патологии, связанные с воспалительным процессом в миокарде, дают основной вклад в неишемическое повышение тропонинов [45, 46]. В раннем исследовании показано, что 34% пациентов с миокардитом, подтвержденным биопсией, имели повышенный (> 3,1 нг/мл) тропонин и 11% с СН, но без миокардита [61]. Повышение тропонина в случаях острого клинического перикардита наблюдается у 22–70% пациентов (от 0,5 до > 50 нг/мл) [62]. В недавнем исследовании при наблюдении 42 пациентов с инфекционным эндокардитом было показано, что «обычный» cTnT опре-

делялся у 25 (56%) больных, а hs cTnT — у 39 (93%). При этом более высокие уровни hs cTnT были связаны с более неблагоприятными исходами [63]. Отметим, что международные правила диагностики инфекционного эндокардита, опубликованные в 2009 г., измерения тропонинов не предусматривают [64].

Повышенные тропонины при ренальной патологии

Полагается, что у пациентов со сниженными ренальными функциями (от умеренного снижения до диализа и до терминальных стадий) повышение тропонина не связано со снижением ренального клиренса [65, 66], но связано с риском неблагоприятных исходов. Так, в мета-анализе, выполненном еще в 2005 г., показано, что у пациентов с ренальной патологией количество случаев повышения тропонина Т находится в диапазоне от 12% до 66%, а тропонина I — от 0,4% до 38%. При этом повышенный cTnT был связан с риском смерти от всех причин, составлявшим 2,64, и с риском сердечно-сосудистой смерти, составлявшим 2,55, риск общей смертности при повышенном cTnI составлял 1,74 [67]. В обнародованных в 2013 г. рекомендациях по диагностике и терапии заболеваний почек полагается, что повышенные при ХБП уровни тропонинов в большей степени вызваны сердечной недостаточностью (повышением массы левого желудочка, дисфункцией левого желудочка, повышенными уровнями NT-proBNP), нежели атеросклерозом или ишемией. При этом подчеркивается, что при сниженных значениях скорости клубочковой фильтрации (< 60 мл/мин/1,73 м²) и при отсутствии ишемических симптомов и характерных изменений на ЭКГ повышенные уровни cTn не обязательно указывают на ОКС [68]. У диализных пациентов повышенные тропонины отражают или скрытую ишемию или ремоделирование миокарда, связанное с гипертрофией ЛЖ [68].

Согласно рекомендациям Национальной академии клинической биохимии США у пациентов с *хронической болезнью почек* (независимо от ее тяжести) измерение тропонина следует проводить при наличии у них ишемических симптомов на ЭКГ [8].

У пациентов с *терминальными стадиями болезней почек* (ТСБП), у которых уровни тропонинов хронически повышены более часто, рекомендуется для диагностики ОИМ концентрацию cTn измерять через 6–9 ч после поступления, при этом диагностически полагать повышение cTn $\geq 20\%$. Измерение хронически повышенных уровней тропонинов при ТСБП может быть полезным для стратификации риска неблагоприятных исходов, при острых клинических изменениях эти уровни могут служить исходными для отслеживания динамики тропонинов [46].

Кардиотоксичность химиотерапевтических препаратов

Еще в 2004 г. было рекомендовано использовать тропонин как маркер, предпочтительный для выявления

повреждений миокарда, вызываемых химиотерапией и включающих систолическую и диастолическую дисфункцию ЛЖ и аритмию. Показано, что повышенные «обычные» тропонины выявляют пациентов, у которых химиотерапия вызывала тяжелое снижение систолической функции ЛЖ и/или летальность. При этом уровень повышения тропонинов был связан с кумулятивной дозой и с выраженностью кардиотоксичности [69]. Полагается, что исследования эффективности высокочувствительного измерения тропонинов весьма перспективны для стратификации кардиальных рисков при химиотерапии и для выявления кардиотоксичности фармпрепаратов [46].

Диагностика ИМ в отделениях интенсивной терапии

Повышение тропонинов у пациентов ОИТ является весьма частым и связано с неблагоприятным прогнозом, притом независимо от природы основной патологии. В некоторых случаях такое повышение тропонинов указывает на ИМ типа 2, связанный с заболеванием коронарных артерий и с повышением потребности в кислороде. У других пациентов ОИТ кардиомаркеры повышены из-за некроза, вызванного катехоламинами и прямым действием циркулирующих токсинов. У некоторых пациентов ОИТ может развиваться и ИМ типа 1.

Выбор необходимых действий при обнаружении повышенного уровня cTn у пациента с моно- или полиорганной патологией, находящегося в критическом состоянии, часто является проблемой для клинициста. Но по мере улучшения состояния пациента после перенесенного критического заболевания встает вопрос о необходимости и глубине дальнейшей оценки тяжести патологии коронарных сосудов [45].

Сепсис и ИМ

Повышение тропонинов при сепсисе наблюдается относительно часто, патофизиологический механизм такого повышения не ясен. Есть некоторые данные, что у пациентов с тяжелым сепсисом и септическим шоком повышенные тропонины связаны с дисфункцией ЛЖ. В настоящее время рутинное измерение cTn у септических пациентов не рекомендуется [46].

Алгоритмы серийных измерений

Конкретных рекомендаций, касающихся алгоритма серийных измерений hs cTn, третье всеобщее определение ИМ не дает. Однако группа экспертов, принимавших участие в его подготовке, в отдельной статье рекомендует оценку динамики значений Tn при поступлении, через 3 ч и, по решению врача в случае неясной картины, через 6 ч (рис. 4).

Подчеркнем, что при поступлении с признаками ОКС первое измерение может дать результат ниже порогового (> 99-я перцентиль $\times 2$). Тем не менее, серий-

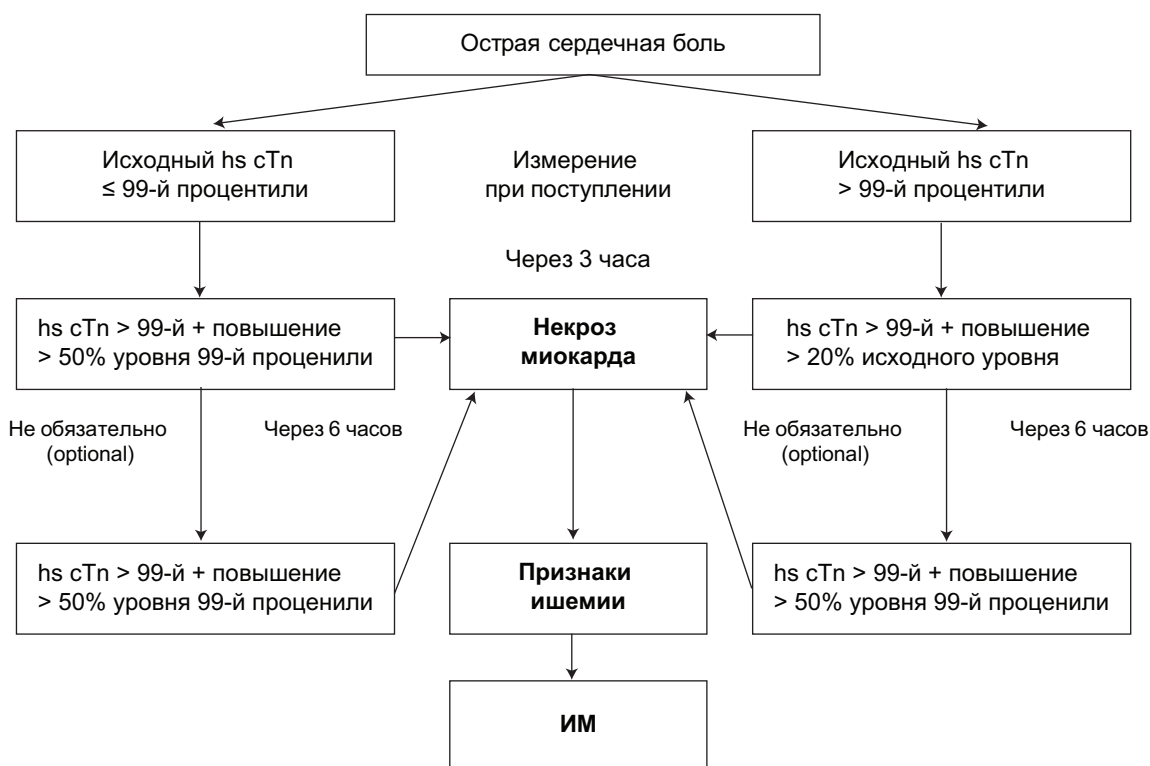


Рис. 4. Алгоритм серийных измерений hs cTn [42]. Подробности в тексте

ные измерения следует проводить и в этом случае, чтобы четко выявить или исключить развивающийся ИМ.

Отметим, что основные производители высокочувствительных тропониновых тестов рекомендуют собственные алгоритмы серийных измерений, предусматривающие определение относительных значений дельты.

Можно ли провести серийные измерения за более короткий период? Недавние публикации свидетельствуют: похоже, что «да». Исследования показали, что пациенты с ОИМ могут быть надежно выявлены в течение 3 ч после поступления и при этом почти со 100%-й чувствительностью и со 100%-м отрицательным предиктивным значением. Это, по мнению авторов, указывает на то, что время, необходимое для исключения ОИМ, может быть существенно снижено [70–72]. Так, для hs cTnI (Abbott) алгоритм рекомендует, что диагностическими являются уровни выше 99-й процентиля и с дельтой > 250% через 3 ч [41]. В другом алгоритме, при исходной концентрации hs cTnT (Roche) ниже или около 99-й процентиля (12 нг/л), повышение hs cTnT через 2 ч по крайней мере > 50% или на > 7 нг/л указывает на развитие ОИМ и оптимизирует точность диагноза [73]. Тест hs cTnI (Singulex Erenna), нижний предел определения — 0,1 нг/л, при 0,8 нг/л значение CV = 10%, 99-я процентиль — 8,0 нг/л. Этот тест определяет cTnI у 95% лиц нормальной популяции. *Исключение ОИМ*: исходный cTnI > 8,0 нг/л, относительная дельта за 90 мин равна или > 30%. Чувствительность — 100%, специфичность — 94,5%. По сравнению с «обычным» cTnI тестом,

тест hs cTnI Singulex с дельтой + 30% за 90 мин выявляет в 3 раза больше случаев ОИМ [74]. Тест hs cTnT (Roche, 99-я процентиль — 14 нг/л). *Подтверждение ОИМ*: исходный hs cTnT = или > 52 нг/л, абсолютная дельта через 1 ч равна или > 5 нг/л; специфичность — 94%, положительное предиктивное значение — 76%. *Исключение ОИМ*: исходный hs cTnT < 12 нг/л, абсолютная дельта 1 ч < 3 нг/л, чувствительность 100%, отрицательное предиктивное значение — 100% [75].

Когда следует назначать высокочувствительное измерение тропонина [46]

Поскольку повышенный тропонин не является строго специфическим для ИМ, его измерение следует проводить только 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 рекомендуется измерять для диагностики ИМ у пациентов с ХПН, *имеющих симптомы ИМ* (независимо от тяжести ренальных нарушений).

Если по итогам исследований не могут быть выполнены специфические вмешательства, рутинное определение уровня тропонина при отсутствии ишемии не рекомендуется, за исключением:

- измерения тропонинов для прогнозирования состояния пациентов, имеющих ХБП,

— измерения тропонинов у пациентов, находящихся на химиотерапии и уже имеющих повреждения миокарда, вызванные фармпрепаратами [46].

В целом, любое повышение уровней тропонинов связано с прогнозом неблагоприятных исходов и притом вне зависимости от их причины.

Итак, первое международное определение ИМ было рекомендовано ВОЗ в 1979 г., первое всеобщее было сформулировано через 21 год, второе всеобщее — через 7 лет, третье — через 5 лет.

Когда и каким будет четвертое?

Благодарности. Автор считает своей приятной обязанностью сердечно поблагодарить д. м. н. проф. Гильманова А.Ж. (Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа) за большую помощь, оказанную при подготовке данной статьи.

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. Babuin L., Jaffe A. S. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury // *CMAJ*. 2005; 173: 1191–202.
3. Luepker R. V., Apple F. S., Christenson R. H. et al. Case definitions for acute coronary heart disease in epidemiology and clinical research studies: a statement from the AHA Council on Epidemiology and Prevention; AHA Statistics Committee; World Heart Federation Council on Epidemiology and Prevention; the European Society of Cardiology Working Group on Epidemiology and Prevention; Centers for Disease Control and Prevention; and the National Heart, Lung, and Blood Institute // *Circulation*. 2003; 108: 2543–9.
4. Ottani F., Galvani M., Nicolini F. A. et al. Elevated cardiac troponin levels predict the risk of adverse outcome in patients with acute coronary syndromes // *Am. Heart J.* 2000; 140: 917–27.
5. Heidenreich P. A., Alloggiamento T., Melsop K. et al. The prognostic value of troponin in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes: a meta-analysis // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 38: 478–85.
6. Ohman E. M., Armstrong P. W., Christenson R. H. et al. Cardiac troponin T levels for risk stratification in acute myocardial ischemia. GUSTO IIA Investigators // *N. Engl. J. Med.* 1996; 335: 1333–41.
7. Antman E. M., Tanasijevic M. J., Thompson B. et al. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes // *N. Engl. J. Med.* 1996; 335: 1342–9.
8. Wu A. H., Apple F. S., Gibler W. B. et al. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases // *Clin. Chem.* 1999 Jul; 45 (7):1104–21.
9. Morrow D. A., Rifai N., Tanasijevic M. J. et al. Clinical efficacy of three assays for cardiac troponin I for risk stratification in acute coronary syndromes: a Thrombolysis In Myocardial Infarction (TIMI) 11B Substudy // *Clin. Chem.* 2000; 46 (4): 453–60.
10. Rao S. V., Ohman E. M., Granger C. B. et al. Prognostic value of isolated troponin elevation across the spectrum of chest pain syndromes // *Am. J. Cardiol.* 2003; 91: 936–40.
11. Newby L. K., Roe M. T., Chen A. Y. et al. Frequency and clinical implications of discordant creatine kinase-MB and troponin

measurements in acute coronary syndromes // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 47: 312–8.

12. Apple F. S., Jesse R. L., Newby L. K. et al. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: analytical issues for biochemical markers of acute coronary syndromes // *Clin. Chem.* 2007; 53 (4): 547–51.

13. Alpert J. S., Thygesen K., Antman E. et al. Myocardial infarction redefined — a consensus document of The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36: 959–69.

14. Meier M. A., Al-Badr W. H., Cooper J. V. et al. The new definition of myocardial infarction: diagnostic and prognostic implications in patients with acute coronary syndromes // *Arch. Intern. Med.* 2002; 162: 1585–1589.

15. Goodman S. G., Steg P. G., Eagle K. A. et al. The diagnostic and prognostic impact of the redefinition of acute myocardial infarction: lessons from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) // *Am. Heart J.* 2006; 151: 654–660.

16. 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.

17. Bonaca M. P., Wiviott S. D., Braunwald E. et al. ACC/AHA/ESC/WHF universal definition of myocardial infarction classification system and the risk of cardiovascular death: observations from the TRITON-TIMI 38 trial // *Circulation*. 2012; 125: 577–583.

18. 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.

19. Thygesen K., Alpert J. S., White H. D., on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the redefinition of myocardial infarction. Universal definition of myocardial infarction // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50: 2173–95.

20. <http://ohsonline.com/articles/2012/08/28/task-force-updates-myocardial-infarction-definition.aspx>

21. Morrow D. A., Cannon C. P., Jesse R. L. et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes // *Clin. Chem.* 2007; 53: 552–74.

22. 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.

23. Вельков В. В. Революция в кардиологии; высокочувствительное измерение кардиальных тропонинов: «тропонин-отрицательное больше нет» // *Клинико-лабораторный консилиум*. 2011; 4 (40): 24–43.

24. Вельков В. В. Высокочувствительное измерение кардиальных тропонинов: тест, который спасает жизни // *Клинико-лабораторный консилиум*. 2012; 1 (41): 47–52.

25. Jaffe A. S. Troponin — past, present and future // *Curr. Probl. Cardiol.* 2012; 37 (6): 209–28.

26. 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.

27. Apple F. S. Standardization of Cardiac Troponin I Assays Will Not Occur in My Lifetime // *Clin. Chem.* 2012; 58 (1): 169–171.

28. Apple F. S. A new season for cardiac troponin assays: it's time to keep a scorecard // *Clin. Chem.* 2009; 55: 1303–1306.

29. *de Lemos J. A., Drazner M. H., Omland T. 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.
30. *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: 2494–2502.
31. *Saunders J. T., Mambi V., de Lemos J. A. et al.* Cardiac troponin T measured by a highly sensitive assay predicts coronary artery disease, heart failure, and mortality in the Atherosclerosis Risk in Communities Study // *Circulation*. 2011; 123: 1367–1376.
32. *White H. D.* Pathobiology of troponin elevations // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 57: 2406–2408.
33. *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.
34. *Latini R., Masson S., Anand I. S. et al.* Investigators. Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure // *Circulation*. 2007; 116: 1242–1249.
35. *Ndrepepa G., Braun S., Mehilli J. et al.* Prognostic value of sensitive troponin T in patients with stable and unstable angina and undetectable conventional troponin // *Am. Heart J.* 2011; 161: 68–75.
36. *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.
37. *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.
38. *Thygesen K., Mair J., Katus H. et al.* Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care // *Eur. Heart J.* 2010; 31: 2197–2204.
39. *Saenger A. K., Beyrau R., Braun S. et al.* Multicenter analytical evaluation of a high-sensitivity troponin T assay // *Clin. Chim. Acta*. 2011; 412: 748–754.
40. *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: 2684–2693.
41. *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.
42. *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.
43. *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, Mar 15; 344: e1533.
44. *Thygesen K., Alpert J. S., Jaffe A. S. et al.* Third Universal Definition of Myocardial Infarction // *Circulation*. 2012; 126 (16): 2020–35.
45. *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.
46. *Blankenship J. C., Tasissa G., O’Shea J. C. et al.* Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibition on angiographic complications during percutaneous coronary intervention in the ESPRIT trial // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 38: 653–8.
47. *Alcock R. F., Roy P., Adorini K. et al.* Incidence and determinants of myocardial infarction following percutaneous coronary interventions according to the revised Joint Task Force definition of troponin T elevation // *Int. J. Cardiol.* 2010; 140: 66–72.
48. *Levine G. N., Bates E. R., Blankenship J. C. et al.* 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions // *Circulation*. 2011; 124: 574–651.
49. *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.
50. *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.
51. *Cantor W. J., Newby L. K., Christenson R. H. et al.* Prognostic significance of elevated troponin I after percutaneous coronary intervention // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 39: 1738–44.
52. *Nienhuis M. B., Ottervanger J. P., Bilo H. J. et al.* Prognostic value of troponin after elective percutaneous coronary intervention: a meta analysis // *Catheter Cardiovasc. Interv.* 2008; 71: 318–24.
53. *Chen M. S., John J. M., Chew D. P., Lee D. S., Ellis S. G., Bhatt D. L.* Bare metal stent restenosis is not a benign clinical entity // *Am. Heart J.* 2006; 151: 1260–4.
54. *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: 1021–1024.
55. *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.
56. *Dickstein K., Cohen-Solal A., Filippatos G. et al.* ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) // *Eur. J. Heart Fail.* 2008; 10: 933–989.
57. *Hunt S. A., Abraham W. T., Chin M. H. et al.* 2009 focused update incorporated into the ACC/ AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation / American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation // *Circulation*. 2009; 119: 391–479.
58. *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.
59. *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.
60. *Mason J. W., O’Connell J. B., Herskowitz A. et al.* The Myocarditis Treatment Trial Investigators A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis // *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 269–75.
61. *Brandt R. R., Filzmaier K., Hanrath P.* Circulating cardiac troponin I in acute pericarditis // *Am. J. Cardiol.* 2001; 87: 1326–8.
62. *Stancoven A. B., Shive A. B., Khera A. et al.* Association of troponin T, detected with highly sensitive assay, and outcomes in infective endocarditis // *Am. J. Cardiol.* 2011 Aug 1; 108 (3): 416–20.

63. *Habib G., Hoen B., Tornos P. et al.* Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer // *Eur. Heart J.* 2009; 30 (19): 2369–413.

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

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

66. *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: 3088–96.

67. *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.

68. *Wallace K. B., Hausner E., Herman E. et al.* Serum troponins as biomarkers of drug-induced cardiac toxicity // *Toxicol. Pathol.* 2004; 32: 106–21.

69. *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.

70. *Reiter M., Twerenbold R., Reichlin T. et al.* Early diagnosis of acute myocardial infarction in the elderly using more sensitive cardiac troponin assays // *Eur. Heart J.* 2011; 32: 1379–1389.

71. *Mueller M., Biener M., Vafae 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: 209–218.

72. *Reichlin T., Irfan A., Twerenbold R., Reiter M. et al.* Utility of absolute and relative changes in cardiac troponin concentrations in the early diagnosis of acute myocardial infarction // *Circulation.* 2011; 124: 136–145.

73. *Schreiber D. H., Agbo C., Wu A. H.* Short-term (90 min) diagnostic performance for acute non-ST segment elevation myocardial infarction and 30-day prognostic evaluation of a novel third-generation high sensitivity troponin I assay // *Clin. Biochem.* 2012; 45 (16–17): 1295–301.

74. *Reichlin T., Schindler C., Drexler B. et al.* One-Hour Rule-out and Rule-in of Acute Myocardial Infarction Using High-Sensitivity Cardiac Troponin T // *Arch. Intern. Med.* 2012; 172 (16): 1211–1218.

ИЗДАТЕЛЬСКО-ПОЛИГРАФИЧЕСКАЯ КОМПАНИЯ КОСТА

Мы сделаем 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**

Правила для авторов, направляющих материалы в редакцию научно-практического журнала «Клинико-лабораторный консилиум»

Уважаемые авторы!

При направлении статьи в редакцию просим соблюдать следующие правила:

Статья должна сопровождаться официальным направлением от учреждения, в котором выполнена работа, иметь визу научного руководителя, заверенную печатью учреждения.

Кроме того, необходимы копии авторского свидетельства, удостоверения на рационализаторское предложение или разрешения на публикацию, если эти документы упомянуты в тексте статьи. На последней странице статьи должны быть подписи всех авторов.

Оформление рукописи:

1. Объем оригинальной статьи, включая таблицы, рисунки и список литературы, не должен превышать 13–15 страниц. Возможна публикация работы путем разбиения на части.

2. Параметры текстового редактора MSWord: шрифт — Times New Roman, размер шрифта — 12 пт, межстрочный интервал — двойной, обязательно соблюдение полей (слева — 3 см, справа — 1,5, сверху и снизу — 2 см). Все страницы должны быть пронумерованы.

3. В начале первой страницы указываются: название статьи, инициалы и фамилия(и) автора(ов), название учреждения, из которого вышла работа, город, резюме — краткое содержание статьи (200–250 слов), ключевые слова (не более 12) на русском и английском языках. В случае если авторы работают в разных учреждениях, это должно быть отмечено цифрами.

4. Оригинальные статьи должны содержать следующие разделы: введение, материалы и методы, полученные результаты, список литературы. В статью также могут включаться материалы обсуждений, дискуссий по проблеме, а также благодарности.

5. В статье указываются данные автора (или одного из авторов): фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность, место работы, адрес (организации), телефон/факс, электронный адрес. Данная информация размещается в статье после названия статьи, ФИО автора(ов), данных организации, резюме и ключевых слов на русском и английском языках в разделе «Данные для корреспонденции».

6. Все сокращения, используемые в статье, должны быть расшифрованы, кроме символов химических элементов и сокращенных названий метрических единиц.

7. Библиографические ссылки:

- Ссылки на литературу, цитируемую в тексте статьи, даются нумерацией арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [1]) и должны соответствовать списку литературы.
- Литературные источники приводятся в конце статьи.
- Список литературы составляется в соответствии с ГОСТ РФ 7.0.5-2008 «Библиографическая ссылка» в порядке цитирования, на отдельной странице. Фамилии иностранных авторов в тексте даются в оригинальной транскрипции (в случае, когда число авторов превышает 3, используются формулировки «et al.» и «и соавт.»).
- Все источники должны быть пронумерованы, а их нумерация — строго соответствовать нумерации в тексте статьи.
- При ссылках на авторефераты диссертаций следует указывать их название.
- Ссылаться на неопубликованные работы нельзя.
- За точность библиографии несет ответственность автор.

8. Упомянутые в тексте статьи лекарственные вещества и методы их введения должны быть утверждены МЗ и СР РФ и разрешены для клинического применения.

9. Таблицы, схемы и рисунки (если они необходимы) оформляются в виде отдельного файла, обозначенного по фамилии автора и (или) названия статьи. В тексте статьи необходимо делать ссылку на каждую таблицу, схему, рисунок, на полях должны быть обозначены места их размещения по тексту (рис. 1, табл. 1 и т. д.). Таблицы, схемы, рисунки должны иметь названия. В подписях приводится объяснение значения всех кривых, букв, цифр и других условных обозначений.

10. В материалах, направленных в журнал, должна быть использована система СИ, за исключением размерности величин, традиционно измеряемых в других мерах.

Статьи, не соответствующие указанным правилам, могут быть возвращены авторам без рассмотрения.

Статьи, ранее опубликованные или направленные в другой журнал, не принимаются.

Все представленные работы рецензируются.

Исправленные автором после рецензирования и перепечатанные рукописи возвращаются в редакцию не позднее одного месяца, а исправленные гранки — через одну неделю.

Авторский гонорар и оплата труда по рецензированию рукописей не предусмотрены.

Рукописи, не принятые к печати, авторам не возвращаются.

Материалы просим присылать по адресу:

197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8, корпус 11, редакция журнала «Клинико-лабораторный консилиум» или доставить лично по данному адресу, предварительно позвонив в редакцию по телефону:

(812) 233-97-26; +7(905) 22-960-22 (Эмануэль Юлия Владимировна).

Предпочтительнее прислать статью по электронной почте по адресу: 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.

КОНТРОЛЬ ГИПЕРГЛИКЕМИИ В КЛИНИКЕ

В.А. КОРОЛЕВ, М.О. МАКАРОВА

Балтийский федеральный университет имени И. Канта, медицинский институт, г. Калининград

Резюме. Диагностика гипергликемии базируется на оценке уровня глюкозы, проведении глюкозо-толерантного теста и определении гликированного гемоглобина. Цель работы — изучение гипергликемии и гликированного гемоглобина у больных с риском критических состояний. Для этого обследовано три группы больных: с цереброваскулярными заболеваниями, с гиперазотемией и с почечной недостаточностью. Нами обнаружено, что HbA1c как показатель гипергликемии образует существенный фактор в изменении тонуса мозговых артерий. Гиперазотемия имеет весомый процент распространения в общей популяции людей. У больных с начальной стадией почечной недостаточности отмечено повышение уровня HbA1c. Рекомендовано обязательное определение HbA1c у больных с критическими состояниями.

Ключевые слова: гемоглобин патологический, заболевания нервной системы, заболевания почек.

HYPERGLYCEMIA CONTROL IN CLINICS

V.A. KOROLEV, M.O. MAKAROVA

Baltic I. Kant Federal University, Medical Institute of Kaliningrad

Summary. The diagnosis of hyperglycemia was based on the fasting plasma glucose, the 2-h value in the 75-g oral glucose tolerance test and the determination of glycosylated hemoglobin. The purpose of investigation is determination of glycosylated hemoglobin by patients with the risk of critical condition. For it the three patients groups were investigated: with cerebrovascular diseases, with hyperazotemia and with the renal insufficiency. We discovered that hyperglycemia and HbA1c formates important factor in the change of the tone of cerebral arteries. Hyperazotemia makes ponderable percent of distribution in the general population of people. The level of glycosylated hemoglobin by patients with latent renal insufficiency was increased. The determination of HbA1c can be used for patients with critical conditions.

Key words: pathological hemoglobin, nervous pathology, kidney diseases.

Данные для корреспонденции

Королев Виталий Александрович — доцент кафедры терапии

ФГАОУ ВПО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта», email: korolew71@yandex.ru

Проблема изменения содержания глюкозы в крови издавна привлекает внимание клиницистов, а ее мониторинг является краеугольным камнем проблемы сахарного диабета (СД) [1]. Гипергликемия (Гпг) — это повышенное содержание глюкозы, которое является следствием преобладания скорости поступления глюкозы в кровь над скоростью ее утилизации [2]. В отдельных исследованиях показано, что Гпг определяет состояние и лучший контроль в клинике внутренних болезней, а ее регулярный контроль обеспечивает снижение ближайшего и отдаленного риска смертности, осложнений заболеваний, продолжительности пребывания больных в госпиталях и стоимости лечения пациентов [3]. В то же время с конца XIX века в клинической практике по-

явился термин «стрессорная гипергликемия», когда начали регистрировать повышение уровня глюкозы в крови при тяжелых ранениях и инфекциях у лиц, не страдающих СД [4]. По некоторым оценкам, около половины пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии имеют повышенный уровень глюкозы. Установленная взаимосвязь тяжести состояния и повышения содержания глюкозы в крови длительное время рассматривалась в качестве адаптивной реакции на повреждение, не требующей неотложной коррекции. До последнего времени Гпг рассматривалась не более как парафеномен заболеваний. Между тем в последнее время стали накапливаться сведения, обосновывающие необходимость пересмотра устоявшейся позиции [5].

Поэтому необходима разработка системы управления гипергликемией и снижения негативных экономических и медицинских последствий для человека, последствий плохого гликемического контроля и связанного с ним прогрессирования осложнений и сопутствующих заболеваний в стационарных условиях [6]. Непосредственными причинами повышения уровня глюкозы в крови являются СД типа 1 с абсолютной недостаточностью инсулина и типа 2, характеризующегося нарушениями как механизмов действия инсулина (инсулинорезистентность), так и его секреции. Гпг возникает и при других формах сахарного диабета, развивающихся вследствие определенных заболеваний или синдромов: заболеваний поджелудочной железы (тяжелые острые и хронические панкреатиты, травмы, резекция, рак, кистозный фиброз, гемохроматоз); заболеваний с гиперпродукцией контринсулиновых гормонов; определенных сложных генетических синдромов, аномалий инсулина; применения лекарственных и химических веществ — гормональных препаратов (соматотропина, глюкокортикоидов и контрацептивов), диуретиков, особенно тиазидовых, некоторых гипотензивных средств; химиотерапевтических препаратов — L-аспарагиназы, циклофосфида, вакора, циклоспорина, диазоксида и др.; психотропных веществ.

В 1997 и 2003 годах экспертный комитет по диагностике и классификации СД рекомендовал выделять группу обследуемых, уровень глюкозы у которых не соответствовал критериям СД, однако, тем не менее, был выше нормы. У больных выделялись нарушение гликемии натощак (5,6 ммоль/л — 6,9 ммоль/л), нарушенная толерантность к глюкозе — через 2 часа после приема 75 г глюкозы во время проведения глюкозо-толерантного теста 7,8–11,0 ммоль/л или гемоглобин А1С 5,7–6,4% [7].

Оценить Гпг можно путем определения глюкозы крови, проведения глюкозо-толерантного теста и гликированного гемоглобина.

Определение глюкозы крови

Методы определения глюкозы крови разделяются на химические и ферментативные [8]. Химические методы основаны на её свойстве восстанавливать различные соединения (двухвалентные ионы меди с образованием одновалентных ионов; пикриновую кислоту с образованием пикраминовой кислоты; красный ферроцианид в желтый ферроцианид и т. д.), то есть основаны на редуцирующих свойствах глюкозы, что весьма специфично в клинико-биохимических исследованиях. Наиболее широко известным является ортотолуидиновый метод, основанный на взаимодействии в кислой среде альдегидной группы глюкозы с аминогруппой ортотолуидина с образованием Шиффова основания. Ортолуидиновый метод достаточно точен, прост в исполнении и специфичен, но недостатком его является использование канцерогенного ароматического амина. Однако некоторые из этой группы способов сопровождаются гемолизом эритроци-

тов и поэтому открывают не только глюкозу, но и другие сахара, приводя к завышенным результатам. Примером является метод Хагедорна–Йенсена, при использовании которого уровень сахара крови составляет 70–120 мг% (4,4–6,6 ммоль/л). Пожалуй, наиболее специфичным способом, основанным на редуцирующих свойствах глюкозы, является метод Сомоджи–Нельсона, основанный на восстановлении меди, который не приводит к гемолизу эритроцитов, а нормальная величина гликемии натощак при определении этой методикой соответствует глюкозооксидазному.

В последние годы широко используются ферментативные методы определения глюкозы, специфичность которых много выше, чем химических методов. Ферментативные методы определения могут быть автоматизированы. Это повышает чувствительность и точность способа определения.

Ферментативные приемы определения глюкозы подразделяются на: колориметрические методы; УФ-методы; флюоресцентные методы; электрохимические методы; «сухие» тест-полоски для полуколичественного определения.

Каждый из этих методов нашел свое место в клинико-диагностических лабораториях, но наиболее широко используемым является глюкозооксидазно-пероксидазный способ с колориметрическим завершением (метод Триндера). Принцип способа заключается в следующем: глюкоза окисляется кислородом воздуха в присутствии фермента глюкозооксидазы с образованием глюконовой кислоты и эквивалентного количества перекиси водорода. Перекись водорода в присутствии пероксидазы окисляет компоненты хромогенной смеси с образованием красителя.

Нормальной величиной гликемии натощак при определении глюкозооксидазным методом считается 60–100 мг% (\approx 3,3–5,5 ммоль/л). Немаловажное значение при определении глюкозы крови играет и то, какая кровь исследуется — капиллярная или венозная. Содержание глюкозы в капиллярной крови выше, чем в венозной, и разница может достигать 20–30 мг%. Как правило, величины нормальной гликемии, которые уже были приведены, относятся к крови, взятой из пальца. Исследование сахара в крови, взятой из пальца, из-за удобства ее получения нашло более широкое распространение и используется повсеместно. В то же время, хотя капиллярная смешанная кровь из пальца и содержит в 100 мг на 1,1 ммоль (20 мг) глюкозы больше, чем венозная, однако уровень глюкозы в плазме или в сыворотке на 10–15% выше уровня в капиллярной крови. Поэтому на практике нередко встает вопрос: каков нормальный уровень «сахара» в крови. Значения 3,3–5,5 ммоль/л — цифры, к которым привыкли большинство исследователей, относятся к содержанию глюкозы крови в капиллярной смешанной крови, а в венозной крови, как уже было упомянуто, уровень глюкозы повышается до 6,1 ммоль/л (табл. 1).

Таблица 1. Стадии гипергликемии. Нарушения регуляции содержания глюкозы. Биохимические критерии (венозная плазма) СД. Нарушение толерантности к глюкозе.

Стадия гипергликемии	Показатель	Концентрация глюкозы, ммоль/л (мг/дл) (венозная плазма)
Сахарный диабет Натощак и/или Через 2 часа после нагрузки глюкозой		> 7,0 (> 126) > 11,1 (> 200,0)
Нарушение толерантности к глюкозе (НТГ) Натощак Через 2 часа после нагрузки глюкозой		< 7,0 (< 126) > 7,8 (→ 140) < 11,1 (< 126)
Нарушение регуляции содержания глюкозы Натощак Через 2 часа после нагрузки глюкозой		> 6,1 (→ 110) и < 7,0 (< 126) < 7,8 (< 140)

Проведение глюкозо-толерантного теста. В докладе комитета экспертов ВОЗ по сахарному диабету (2003) придается значение уровню сахара крови только через 2 часа после приема глюкозы. ГТТ с использованием нагрузки 75 г глюкозы является наиболее специфичным для диагностики гипергликемии. Глюкоза разводится в 300 мл дистиллированной воды и выпивается в течение 5 минут. Однако должны быть соблюдены определенные условия при проведении ГТТ. Обследуемые должны три дня до пробы находиться на диете, содержащей не менее 250 г углеводов. В течение 15 минут до исследования и на протяжении всей ГТТ пациенты должны находиться в удобном положении, сидя или лежа. Движения, работа, разговоры могут влиять на результаты ГТТ. В то же время динамика ГТТ у больных трудно предсказуема. В 53,6% случаев даже ГТТ диабетического типа может нормализоваться без лечения, в 15,6% остается нормальным, несмотря на явные повышения глюкозы крови. Немало проблем и в расчете глюкозы, которую необходимо принять. Наиболее целесообразно назначать глюкозу в количестве 50 г на 1 м² поверхности тела, которая рассчитывается по таблицам Дюбуа, используемым при определении основного обмена.

Гликированный гемоглобин

Были проведены следующие проспективные исследования в области контроля СД: Исследование по контролю диабета и его осложнений (The Diabetes Control and complications Trial) [9], Великобританское проспективное исследование диабета (United Kingdom Prospective Diabetes Study) [10], Action in Diabetes and Vascular Disease [11], Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes [12]. Согласно этим исследованиям, ГлГем является ведущим параметром в контроле гипергликемии. В то же самое время показатель ГлГем недостаточно применяется в практической работе врачей различных специальностей. Это, по-видимому обуслов-

лено как неполным пониманием самого ГлГем, так и разнообразием методов его определения. Какую же методику выбрать? Каковы нормальные значения ГлГем? В отдельных исследованиях показано, что не столь важно наличие самого СД, сколько повышенного уровня ГлГем в оценке риска развития осложнений артериальной гипертензии [13]. То есть данный показатель следует понимать как в узком, так и в широком смысле этого слова [14].

В узком смысле этого слова ГлГем может быть представлен следующим образом. Согласно заключению Международного экспертного комитета, ГлГем представляет собой точный и надежный показатель, отражающий состояние хронической гликемии и коррелирующий с риском развития хронических осложнений СД. При этом исследование ГлГем имеет ряд преимуществ по сравнению с лабораторным методом определения глюкозы, так как оно не зависит от времени суток, физических нагрузок, приема пищи, назначенных лекарств, эмоционального состояния пациента и т. д. При этом СД диагностируется при содержании ГлГем более 6,5% и диагноз должен подтверждаться повторным измерением [15]. Поэтому применение теста на определение ГлГем представляется наиболее информативным и экономически обоснованным. Однако, согласно рекомендациям по использованию теста на ГлГем (American Diabetes Association), IDF (International Diabetes Federation), EASD (European Association for the Study of Diabetes) [16], предполагается применение методов исследования ГлГем, сертифицированных на соответствие требованиям Национальной программы США по стандартизации гликогемоглобина (The National Glycohemoglobin Standardization Program) (NGSP) и стандартизованных относительно референсного метода DCCT [17]. Что это означает? Это означает, что коэффициент вариации (CV%) используемого метода должен быть ниже 3%, доверительный интервал (ДИ 95%) относительно референсной лаборатории не более ± 0,75.

Ежегодное подтверждение сертификата NGSP для производителей анализаторов и наборов реагентов. Однако следует учесть, что программа NGSP разрабатывалась для научных исследований, а не для клинической практики, поэтому она недостаточно приемлема для лабораторий низкого и среднего уровня, при скрининговых обследованиях и мониторинге гликемического статуса. Исходя из этих данных, фактическое применение ГлГем довольно редко и непопулярно [18]. Согласно рекомендациям Международной федерации диабета (International Diabetes Federation), использование ГлГем для контроля СД необходимо [19], а для определения этого показателя в настоящее время поставлен вопрос о разработке альтернативных, принципиально новых методов определения ГлГем [20]. Тем не менее, в нашей стране получают распространение автоматические анализаторы для определения ГлГем, в основе которых лежит метод высокоэффективной жидкостной хроматографии под высоким давлением (HPLC), и референсным для такого метода будет являться метод HPLC под высоким давлением на большой колонке. В таком случае потребуется ежегодное сравнение с классическим HPLC и получение сертификата NGSP. Например, определяя уровень ГлГем методом HPLC на анализаторе Bio-Rad, необходимо сравнить его с референсным методом, каковым, например, может являться газожидкостная хроматография на большой колонке или изоэлектрическое фокусирование в широком градиенте pH. Сравнение должно проводиться одним и тем же лаборантом, в одной и той же лаборатории, и желателен тщательно выдерживать температурный режим атмосферного воздуха, влажность и уровень атмосферного давления. Поэтому даже в США уровень гликированного гемоглобина определяется референсным методом HPLC не во всех случаях. При определении этого параметра в США указы-

вается standardized (стандартизированный) или non-standardized (применен другой метод) [11].

В широком понятии ГлГем представляется как важное патогенетическое звено в развитии патологии в организме. При этом разнообразие методов определения ГлГем не затрудняет, а, наоборот, дополняет и расширяет понимание ГлГем. Например, примененный нами комбинированный способ, состоящий из высокоспецифического метода изоэлектрического фокусирования и доступного, легко выполнимого фотокolorиметрического приема, позволяет не только точно определять ГлГем, но и использовать его в лаборатории любого уровня. И несмотря на то, что этот метод является ручным, многоэтапным, он может быть применен наряду с автоматизированным (одноэтапным) способом. То есть в таком понимании существующие способы, хоть даже и ручные, многоэтапные, будут дополнять представление о ГлГем. По-другому будет представлен и сам ГлГем, если данный параметр рассматривать не только как продленный индекс гликемии, но и как через возникающую Гпг, в том числе и стрессорную, большим параметром, который является маркером развивающегося в организме человека и связанного с гипергликемией оксидативного стресса и нарушений процессов гликирования. В таком понимании ГлГем представляется не просто как продленный индекс гликемии, а как один из основных патогенетических механизмов в развитии обменных, сосудистых нарушений и органной дисфункции. При этом по-другому будет представлена и воспроизводимость применяемых методов. Являясь интегральным индексом гликемии, вариация этого показателя фактически соответствует вариации глюкозы крови, то есть 3–6% [21], или общего гемоглобина крови (4%). Будучи патогенетическим звеном в развитии патологии в организме, ГлГем уже представляется не просто обычным, рядовым

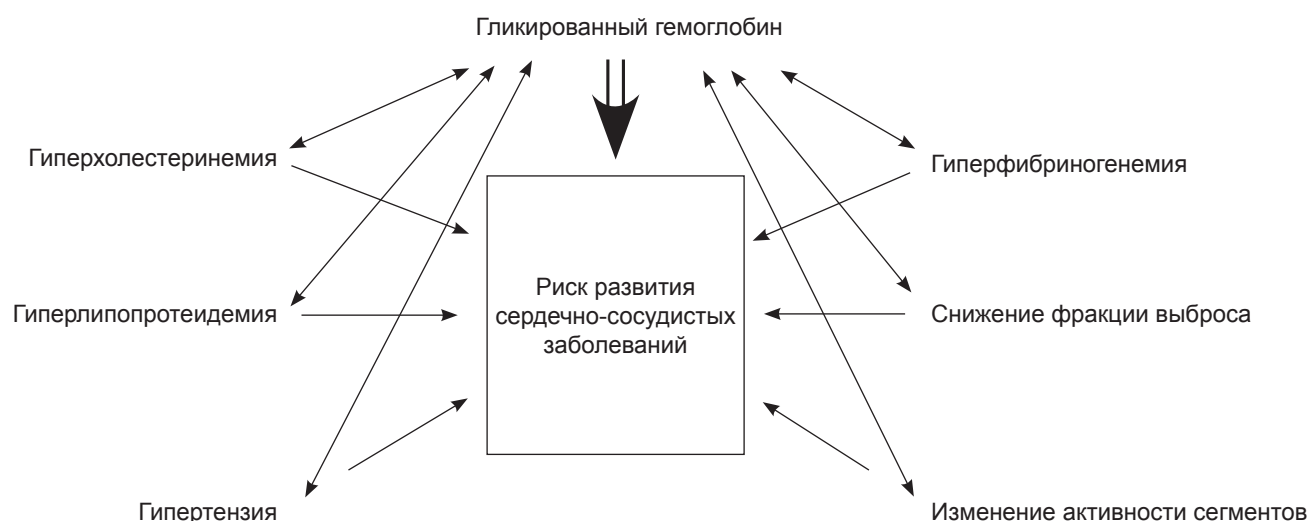


Рис. 1. Патогенетическая роль ГлГем в риске развития сердечно-сосудистых заболеваний

Таблица 2. Внутрисерийная воспроизводимость результатов определения уровня ГлГем у обследуемых с отсутствием СА

Показатель	Примеры				
	1	2	3	4	5
ГлГем, %	4,32	3,18	2,62	4,89	2,39
	4,55	3,64	3,40	4,89	2,50
	4,55	3,86	3,41	5,12	2,61
	4,77	3,86	3,76	5,12	2,61
	4,89	3,98	3,98	6,14	2,84
	5,00	4,43	4,10	6,26	3,07
	5,35	4,55	4,20	7,39	3,53
	5,35	5,00	4,67	7,85	
			4,67	8,31	
n	8	8	9	9	7
X _{ср}	4,847	4,063	3,868	6,219	2,793
X _q	4,860	4,098	3,917	6,346	2,817
σ	0,376	0,573	0,658	1,340	0,395
S _x	0,133	0,203	0,219	0,447	0,149
V%	7,763	14,103	17,006	21,543	14,152

Примечание: n – количество показателей,
 X_{ср} – среднее арифметическое введенных показателей,
 X_q – среднее геометрическое введенных показателей,
 σ – среднее квадратическое отклонение,
 S_x – стандартная ошибка средней арифметической,
 V% – коэффициент вариации

биохимическим показателем. Участвуя в патогенезе многих заболеваний, ГлГем фактически связан с основными клинико-биохимическими показателями нарушенного обмена веществ в организме — углеводного, белкового, жирового, минерального, которые имеют воспроизводимость значительно более высокую, чем 3–4% [22]. Нами показано, что воспроизводимость методов определения ГлГем может варьировать в довольно широких пределах (табл. 2).

Гпг является непременным атрибутом ранней фазы инсульта. Так, Гпг (> 6 ммоль /л) обнаруживают у 2/3 больных с ишемическим инсультом [23]. Данная Гпг определяет значительное отягощение прогноза инсульта, увеличивая риск фатального исхода в сравнении с лицами с нормогликемией в 3 раза и увеличивая в 1,4 раза риск плохого функционального исхода [24].

Кроме того, исследования последних лет свидетельствуют, что гликемия, скорректированная инсулинотерапией, сокращает объем ишемизированного мозгового повреждения, а исследования моделей инсульта у животных подтверждают, что вызванная стрессом Гпг яв-

ляется поддающимся изменению фактором риска для мозгового повреждения [24]. С данных позиций имеет существенный интерес изучение существования возможного молекулярного предиктора гипергликемического состояния у больных с нарушениями мозгового кровообращения.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы явилось определение уровня Гпг у больных с цереброваскулярными заболеваниями, а также у больных с почечной недостаточностью и отклонениями в функциональном состоянии почек.

Материалы и методы

Нами обследовано три группы больных. Первую группу больных составили 12 пациентов с сосудистыми мозговыми синдромами, экстрапирамидными и дегенеративными нарушениями нервной системы, у которых было проведено комплексное клинико-неврологическое, нейровизуализационное и лабораторное обследование. Среди обследованных были 1 больной с синдромом средней мозговой артерии, 1 больной с нейрциркуляторной

астенией, 6 больных с дисциркуляторной и смешанного генеза энцефалопатией, 1 больной с болезнью Паркинсона, 1 больной с рассеянным склерозом, 1 — с миастенией, 1 — с полиневропатией. У двоих больных, а именно у больного с синдромом средней мозговой артерии, у больного с энцефалопатией и у больного с болезнью Паркинсона был выявлен явный СД. Больным проводили спиральную компьютерную томограмму (General Motors High Speed, США) с целью установления вида мозгового инсульта (локализацию и размеры ишемии мозга, степень выраженности отека мозга) и исключения других патологических состояний, имитирующих ОНМК.

Степень тяжести мозгового инсульта, выраженность и динамику (на 7–14 день) очагового неврологического дефицита у больных с ишемическим инсультом, уровень сознания оценивали Скандинавской шкалой инсульта (SSS) [25].

Для оценки индивидуального риска возникновения инсульта у больных с сахарным диабетом (СД) использовали шкалу ABCD2 (Age — возраст, Blood pressure — АД, Clinical features — клинические проявления, Duration — длительность, Diabetes — диабет) [26].

Также проводили контроль АД, рентгенографию органов грудной клетки, термометрию, стандартные лабораторные тесты, включающие общий анализ крови, общий анализ мочи, RW, биохимические исследования: определение трансаминаз, желчных пигментов, глюкозы крови, азотемии, электролитов, коагулограмму.

Из специальных методов обследования проводили определение ГлГем методом ионно-обменной хроматографии под высоким давлением на анализаторе Lutaschek [27].

Из инструментальных методов обследования проводили электрокардиографию и реоэнцефалографию. При изучении тонуса сосудов при помощи РЭГ учитывали пульсовое артериальное кровенаполнение, минутное артериальное кровенаполнение, тонус магистральных артерий, суммарный тонус регионарных артерий, тонус регионарных артерий крупного, среднего и мелкого калибра, а также реографический диастолический индекс (венозный отток).

Все пациенты получали стандартную базисную и дифференцированную терапию ишемического инсульта [28].

Вторую группу больных составили отдыхающие санаториев курорта «Мисхор». У этих обследуемых мы определяли функцию почек по показателям первостепенной важности — удельному весу мочи (610 человек) и уровню креатинина крови (209 больных). Все пациенты находились на лечении в здравницах по поводу ишемической болезни сердца, гипертонической болезни, хронических обструктивных заболеваний легких. Проведенное обследование больных включало в себя клиническое, лабораторное (общеклинические и биохимические анализы), инструментальное — проведение электрокардиографических, спирографических, мони-

торинговых (артериальное давление, холтеровское исследование) исследований.

В третью группу наблюдаемых нами больных вошли пациенты с почечной недостаточностью. Для этого мы обследовали несколько пациентов с болезнями почек и отсутствием СД. Среди обследованных были больные, которые находились на стационарном лечении в урологическом отделении, с хроническим гломерулонефритом, мочекаменной болезнью и хроническим пиелонефритом, поликистозом почек, единственной почкой. Нами были подобраны именно те больные, у которых был повышен риск пред- или послеоперационного периода. Уровень ГлГем у этой группы людей определяли на автоматическом анализаторе Bio-Rad [27].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 8.0 (StatSoft, США), программного обеспечения SPSS17.

Результаты

У больной женщины с мозговым инсультом (МИ) в бассейне левой средней мозговой артерии (СМА) в виде правостороннего центрального гемипареза с церебральным атеросклерозом и СД тип 2 уровень гликемии в течение суток варьировал от 5,0 ммоль/л до 14,7 ммоль/л, а уровень ГлГем составил 12,7%.

Было обнаружено, что у других пациентов был также повышен уровень ГлГем, что свидетельствовало о развитии Гпг у больных с цереброваскулярными заболеваниями (табл. 3). При этом у этих 12 больных уровень ГлГем имел сильную достоверную корреляцию с содержанием глюкозы крови в 17-00 и 21-00 час (табл. 4).

Для установления взаимосвязи Гпг и тонуса мозговых артерий у 12 больных с цереброваскулярными заболеваниями был проведен факторный анализ. Данные определения функционального состояния мозговых артерий составили 5 факторов. Первый фактор составили пульсовое и минутное кровенаполнение, второй — тонус магистральных артерий и суммарный тонус регионарных артерий — пульсовое и минутное кровенаполнение, третий фактор составил тонус регионарных артерий крупного и среднего калибра, четвертый фактор — диастолический индекс (то есть тонус артерий мелкого калибра) и реографический диастолический индекс (венозный отток). Пятым фактором были собственно основные показатели метаболического контроля: уровни гликемии натощак, в течение суток и уровень HbA1c. Выбор этих пяти факторов был осуществлен на основании проведенного дисперсионного анализа.

Так, например, первый фактор объясняет 36,65% дисперсии, второй фактор — 26,34% дисперсии, третий фактор — 15,33, четвертый — 11,55%, а пятый (Гпг и ГлГем) фактор, казалось бы, составил только 4,84% дисперсии. Однако суммарный процент дисперсии у пятого фактора был наибольшим по сравнению с другими факторами и составил 94,1% (табл. 5).

Таблица 3. Уровни глюкозы крови и гликированного гемоглобина у больных с нарушением мозгового кровообращения

Показатели Больные	пре-гл (ммоль/л)	гл 12 ч (ммоль/л)	гл 17 ч (ммоль/л)	гл 21 ч (ммоль/л)	случ. гликемия (ммоль/л)	глик. гем. (%)
1	7,0	15,2	8,2	7,6	10,4	8,2
2 СД+	17,2	24,5	16,6	21,1	15,7	10,9
3	4,7	6,4	8,2	7,0	4,9	6,8
4	7,0	4,7	5,8	4,9	6,9	6,2
5	15,2	13,5	15,2	15,8	7,6	9,6
6	5,2	5,0	5,8	7,0	4,9	5,3
7		4,7	6,4	6,0	4,9	5,4
8 СД+	5,5	5,0	14,7	9,4	5,4	12,7
9	7,0	5,2	7,6	6,1	5,0	6,0
10 СД+	10,6	5,4	11,1	12,0		12,9
Общее количество	9	10	10	10	9	10
Средняя арифметическая	8,82	8,96	9,96	9,79	7,3	8,4
Ошибка средней арифметической	1,5	2,1	1,3	1,6	1,2	0,9
Минимальное значение	4,7	4,7	5,8	4,9	4,9	5,3
Максимальное значение	17,2	24,5	16,5	21,1	15,7	12,9
Стандартное отклонение	0,72	0,69	0,69	0,69	0,72	0,69

Примечание: пре-гл – уровень глюкозы крови натощак,
гл 12 ч, гл 17 ч, гл 21 ч – уровень глюкозы крови соответственно в 12, 17 и 21 час,
глик. гем. – уровень гликированного гемоглобина, %

Таблица 4. Корреляционная связь уровней гликированного гемоглобина и гликемии

Показатель гликемии (ммоль/л)	Уровень гликированного гемоглобина, %	
	Корреляция Пирсона	
	Корреляционный коэффициент (r)	Достоверность (p)
Препрандиальная гликемия	+0,46	0,212
Гликемия в 12 ч	+0,324	0,360
Гликемия в 17 ч	+0,819	0,004
Гликемия в 21 ч	+0,629	0,050
Случайная гликемия	+0,486	0,185

Таблица 5. Факторный анализ. Процентное содержание факторной нагрузки гипергликемии и функционального состояния мозговых артерий

Фактор	Факторная нагрузка	
	Процент дисперсии	Совокупный процент
1	36,65	36,65
2	26,34	62,99
3	15,33	78,32
4	11,55	89,88
5	4,84	94,71

Таблица 6. Факторный анализ. Зависимость показателей гипергликемии от факторов

	Фактор				
	1	2	3	4	5
Препрандиальная гликемия (ммоль/л)	0,915*	0,039	0,238*	- 0,192	- 0,185
Гликемия в 12 ч (ммоль/л)	0,788*	0,159	0,415*	- 0,326	0,261
Гликемия в 17 ч (ммоль/л)	0,920*	0,130	- 0,079	0,231*	- 0,0247
Гликемия в 21 ч (ммоль/л)	0,956*	0,0903	0,241*	0,049	0,057
Случайная гликемия (ммоль/л)	0,726*	0,221*	0,231*	- 0,472*	0,375
Гликированный гемоглобин (%)	0,749*	0,234*	- 0,346	0,236*	0,173

Примечание: * — достоверные корреляции

Было обнаружено, что показатели гомеостаза глюкозы, в том числе ГлГем, наиболее существенно связаны с первым фактором, то есть с пульсовым и минутным кровенаполнением (табл. 6). В то же время изменения в однократно взятых уровнях гликемии в течение суток в основном отражают изменения во втором и в третьем факторах. Таким образом, правомочно предположить, что уровень гликемии является индикаторным индексом изменений в мозговых артериях крупного калибра на момент обследования.

При факторном анализе уровня ГлГем была выявлена связь не только с изменением тонуса магистральных артерий, но и с изменением тонуса артерий мелкого калибра и степенью нарушений венозного оттока (табл. 6). Действительно, в генезе структурных изменений в стенке сосудов при СД важное место отводится роли конечных продуктов гликирования, которые, как было показано, приводят к развитию эндотелиальной дисфункции и способствуют повышению артериальной жесткости [29].

Мы изучили факторную нагрузку изучаемых пяти факторов, которые состоят из факторных составляющих (рис. 2). Для этого мы провели вращение этих 22 факторных составляющих, то есть определили, как они рас-

пределяются в пространстве. Как видно из рисунка, факторные составляющие пятого фактора, то есть «18» гликемия в 12 ч, «19» гликемия в 17 ч, «20» гликемия в 21 ч, «21» случайная гликемия, «22» гликированный гемоглобин, %, находились в той же области, что и факторные составляющие второго и третьего факторов, то есть «9» тонус регионарных артерий крупного калибра (hd), ом\с левая, «10» тонус регионарных артерий крупного калибра (hd), ом\с правая, «11» тонус регионарных артерий среднего калибра ((h1-h4) \A2), ом\с, «12» тонус регионарных артерий среднего калибра ((h1-h4) \A2), ом\с.

При этом основные показатели гипергликемии были корреляционно связаны с основными функциональными параметрами состояния мозговых артерий, а именно пульсовым и минутным кровенаполнением (1 фактор), а также с тонусом мозговых артерий различного калибра, составляющих 2, 3, 4 факторы (помечено звездочкой — достоверные корреляции) (табл. 6).

Мы сопоставили значения уровней гликемии и ГлГем с одной стороны, клиничко-неврологический статус, оцененный в баллах по Скандинавской шкале инсультов SSS, с другой, и показателей ультразвуковой доплерографии с третьей стороны, у обследуемых нами больных. При

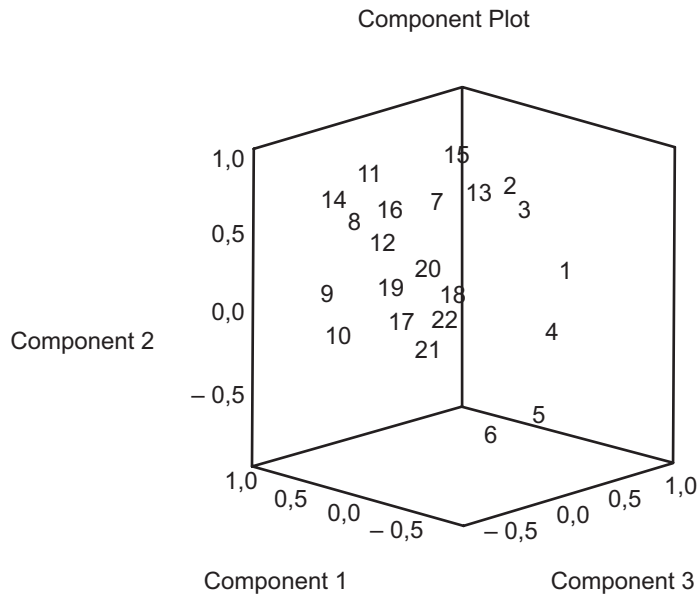


Рис. 2. Компонентная диаграмма после вращения факторных составляющих,

- где:
- 1 – Пульсовое артериальное кровенаполнение ($h1/hk$), б\р левая,
 - 2 – Пульсовое артериальное кровенаполнение ($h1/hk$), б\р правая,
 - 3 – Минутное артериальное кровенаполнение (Vm), мл, левая,
 - 4 – Минутное артериальное кровенаполнение (Vm), мл, правая,
 - 5 – Тонус магистральных артерий (T), с левая,
 - 6 – Тонус магистральных артерий (T), с правая,
 - 7 – Суммарный тонус регионарных артерий (A), с левая,
 - 8 – Суммарный тонус регионарных артерий (A), с правая,
 - 9 – Тонус регион. артерий крупного калибра (hd), ом\с левая,
 - 10 – Тонус регион. артерий крупного калибра (hd), ом\с правая,
 - 11 – Тонус регионарных артерий среднего калибра ($(h1-h4) \sqrt{A2}$), ом\с,
 - 12 – Тонус регионарных артерий среднего калибра ($(h1-h4) \sqrt{A2}$), ом\с,
 - 13 – Дикротический индекс (тонус артерий мелкого кал.) ($h2/h1$), б\р левая,
 - 14 – Дикротический индекс (тонус артерий мелкого кал.) ($h2/h1$), б\р правая,
 - 15 – Реограф. диастолич. индекс (венозный отток) ($h3/h1$), б\р левая,
 - 16 – Реограф. диастолич. индекс (венозный отток) ($h3/h1$), б\р правая,
 - 17 – Препрандиальная гликемия, ммоль/л,
 - 18 – Гликемия в 12 ч,
 - 19 – Гликемия в 17 ч,
 - 20 – Гликемия в 21 ч,
 - 21 – Случайная гликемия,
 - 22 – Гликированный гемоглобин, %
- Component 1, 2, 3 – Корреляционные коэффициенты

этом следовало бы отметить, что повышение содержания глюкозы крови соответствовало доплерографическим изменениям в магистральных артериях и сосудах крупного калибра, тогда как повышение уровня ГлГем соответствовало также и изменениям в артериях мелкого калибра. Наиболее полная неврологическая картина, соответствующая наименьшему количеству баллов по шкале SSS, была при уровне ГлГем выше 6%. В то же время нормальное содержание ГлГем, даже при наличии Гпг, соответствовало большему количеству баллов (табл. 7).

У других больных, которые находились в санатории, мы оценили функцию почек по показателям первостепенной важности – удельному весу мочи и уровню креатинина крови. Нами обнаружено, что у 74 человек из

610 обследуемых удельный вес мочи был ниже 1018, а у 131 обследуемого из 209 больных уровень креатинина крови был выше 0,088 ммоль/л (табл. 8). Нормальные величины уровня креатинина крови представлены в справочнике по лабораторным методам исследования в клинике [30].

У больных с почечной недостаточностью уровень креатинина крови повышался в течение нескольких дней до 0,3 ммоль/л. Нами обнаружено, что у этих больных был повышен уровень гликированного гемоглобина А1с. У обследованных пациентов он составил 7,8–7,9–7,7–7,5–7,9%. В то же время у обследованной группы людей следует отметить повышение другой минорной фракции гликогемоглобина – HbA1a 6,7–7,6–7,2–6,2–5,8%.

Таблица 7. Схема оценки риска инсульта по показателям гликемии

	Показатели углеводного обмена	Баллы	Факторы риска	Показатели ультразвуковой доплерографии
1.	Гипергликемия и $HbA_{1c} < 6\%$	10 и более баллов	артериальная гипертензия, курение, употребление алкоголя, стресс	Нарушение средней скорости кровотока в магистральных сосудах (средняя скорость кровотока по общим сонным артериям у взрослых людей до 60 лет от 14 до 30 м\с), изменение индекса циркуляторного сопротивления сосудов (ИЦС) (нормальные цифры ИЦС 0,55–0,75)
2.	Нормогликемия и $1сHbA_{1c} > 6\%$	менее 10 баллов	артериальная гипертензия, курение, абдоминальное ожирение, нарушение диеты	Нарушение скорости кровотока в сосудах крупного и среднего калибра (нормальная скорость кровотока по позвоночным артериям $13 \pm 5,1$ см\с), изменение ИЦС (нормальные цифры ИЦС 0,55–0,75)
3.	Гипергликемия и $HbA_{1c} > 6\%$	1–2 балла	артериальная гипертензия, курение, абдоминальное ожирение, нарушение диеты, сахарный диабет	Нарушение скорости кровотока в сосудах крупного, среднего и мелкого калибров (средняя скорость кровотока по надблоковым артериям от 6 до 16 см\с), изменение ИЦС (нормальные цифры ИЦС 0,55–0,75)

Таблица 8. Функция почек по уровню креатинина крови и удельному весу мочи

Количество	Показатели	Удельный вес		Уровень креатинина крови	
		Все обследованные	Меньше 1018	Все обследованные	Больше 0,088 ммоль/л
n		610	74	209	131

Обсуждение полученных результатов

Повышение уровня глюкозы крови обычно встречается в ранней фазе инсульта. Распространенность Гпг, характеризующейся как повышение глюкозы крови выше 6,0 ммоль/л (109 мг\дл), наблюдается в двух третях всех вариантов ишемических инсультов и как минимум в 50% микроинсультов [31]. Обзор литературы свидетельствует о том, что появление преобладающей, стресс-обусловленной Гпг ассоциируется с плохим прогнозом, таким как зависимое состояние или геморагический инсульт. Персистирующая Гпг выше 155 мг\дл ассоциируется с повышением смертности. В то же время в последние годы установлено, что у пациентов с МИ предиктором летального исхода в течение года наблюдения рекомендуется рассматривать уровень глюкозы капиллярной крови при поступлении в стационар более 5,8 ммоль/л [32]. Уровень ГлГем у пациентов, страдающих СД, определяет степень компенсации углеводного обмена в острейшем и остром периодах мозгового инсульта. Для предотвращения возможного неблагоприятного исхода мозгового инсульта у пациентов с повышенным содержанием ГлГем необходимо проведение интенсивной сахароснижающей терапии.

Наши исследования подтвердили, что развитие различных заболеваний нервной системы, таких как воспалительные заболевания центральной нервной системы, экстрапирамидные и двигательные нарушения, цереброваскулярные болезни, сопровождается развитием гипергликемии, как по уровню глюкозы крови, так и по уровню ГлГем. При этом различные маркеры углеводного обмена по-разному отражают изменения в тонусе церебральных сосудов различного калибра. Стрессорной гипергликемии соответствуют изменения в магистральных артериях, которые подтверждены результатами РЭГ и доплерографии. Крупные исследования Diabetes Control & Complications Trial, а также UK Prospective Diabetes Study доказали, что гликированный гемоглобин является, в первую очередь, предиктором микроангиопатий. По данным этих исследований, снижение уровня гликированного гемоглобина в среднем на 1% сопровождалось уменьшением нейропатий от 18% у больных инсулиннезависимым СД до 35% у больных инсулинзависимым СД. Проявлением микроангиопатии сосудов головного мозга является энцефалопатия [33]. В наших исследованиях обнаружено, что из 9 обследованных больных с энцефалопатией уровень ГлГем был выше 8% у 3, то есть у 30% обследованных больных,

а у остальных был нормальным. Эти данные согласуются с мнением других исследователей [34], свидетельствующих о том, что относительный риск нейропатий значительно возрастает с увеличением концентрации ГлГем. Эти данные также подтверждают результаты и тех исследований, которые доказывают резкое возрастание риска инсультов при уровнях ГлГем выше 7%. Это же подтверждает и исследование у некоторых больных с ишемическим инсультом. Так, например, при уровне 9,4% нами был диагностирован ишемический инсульт у женщины 58 лет с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2 типа. В то же время у больного Ш. при повторном ишемическом инсульте и отсутствии СД уровень ГлГем был 6,3%, тогда как показатели гликемического профиля варьировали от 8,3 до 5,4 ммоль/л. Согласно соответствию уровня ГлГем среднесуточному содержанию гликемии, концентрация ГлГем, равная 6,3%, соответствует уровню глюкозы крови $\approx 7,8$ ммоль/л [33]. То есть даже у этого больного с относительно невысоким уровнем ГлГем имеется риск развития ишемического инсульта по среднему уровню глюкозы крови.

Острая почечная недостаточность (ОПН) — это синдром острого нарушения почечных функций, выражающийся гидремией, гипергидратацией, дисэлектролитемией, азотемией, нарушением кислотно-щелочного равновесия. Олигоанурическая ОПН встречается в 25% случаев, а неолигоанурическая ОПН — в 75%. Первый признак ОПН — повышение концентрации азотистых компонентов крови. Второй признак ОПН — олигурия (наблюдается в 50–70% случаев).

Классификация вариантов ОПН. В 2004 году Acute Dialysis Quality Initiative Workgroup (Острая диализная квалификационная инициативная рабочая группа) предложила многоуровневую классификацию острого поражения почек, названную RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function, and End-stage kidney disease) [35].

1. Риск (R) — увеличение уровня креатинина в 1,5 раза или снижение СКФ на 25% или снижение диуреза на 0,5 мл/кг/час при 6-часовом измерении.
2. Повреждение (I) — увеличение уровня креатинина сыворотки в 2 раза или снижение СКФ на 50%, или уменьшение диуреза на 0,5 мл/кг/час при 12-часовом измерении.
3. Несоответствие (F) — увеличение уровня креатинина сыворотки крови в 3 раза или снижение СКФ на 75%, или увеличение уровня креатинина сыворотки более чем 4 мкмоль/л/день, снижение диуреза менее 0,3 мл/час при 2-часовом измерении или анурии в течение 12 часов.
4. Потеря функции (L) — перестирование или выпадение функции в течение более 4 недель.
5. Терминальная стадия (E) — потеря почечной функции на срок более 3 месяцев.

Повышение уровня ГлГем при ХПН отмечается издавна. Первые сообщения об этом появились еще в пер-

вой половине 70-х годов прошлого столетия. Сначала этот феномен объясняли наличием часто встречающейся гипергликемии у больных с ХПН на диализе. Затем было доказано, что содержание ГлГем повышалось вне зависимости от наличия или отсутствия глюкозы в диализирующем растворе [36]. В то же время у некоторых больных с прогрессированием почечной недостаточности может наблюдаться резкое снижение ГлГем. До последнего времени не было, к сожалению, полноценной теории, объясняющей факт изменения ГлГем при ХПН. Дело в том, что ГлГем всегда представлялся как показатель длительного гликемического контроля. Следовательно, его значение важно как для оценки гипергликемии, так и гипогликемии. В то же время ГлГем является ведущим гликоконъюгатом и поэтому напрямую связан с процессами гликирования, оксидативного стресса, свободнорадикального окисления. Доказательством этому явилось обнаруженное разными исследователями, а также нами повышение гликированного гемоглобина не только у больных сахарным диабетом, но и при заболеваниях, влияющих на него. Также показано, что содержание HbA1c изменяется до и после почечной восстановительной терапии и может служить для экспертизы нормальной почечной функции [37]. Известно, что гликированная форма гемоглобина HbA1 состоит из трех минорных фракций HbA1a, HbA1b и HbA1c в соотношении 1 : 1 : 3. Именно с третьей минорной фракцией отождествляют общий гликогемоглобин и обозначают его как HbA1c. В то же время установлено, что гликирование минорной фракции гемоглобина A1a происходит в основном за счет фруктозы [38]. То есть повышение этого гликогемоглобина у больных с почечной недостаточностью подтверждает значение гликирования в генезе развития ренальной дисфункции. При этом немаловажное значение имеет и то, какой метод для определения гликогемоглобина используется. Для определения фракции A1c лучше всего использовать метод изоэлектрического фокусирования, так как при фокусировании изолированно отделяется от основного гемоглобина A именно эта минорная фракция, тогда как другие фракции не отделяются. В то же время для определения фракции A1a необходимо использовать высокоэффективную жидкостную катион-обменную хроматографию под высоким давлением.

Выводы:

1. Возникновение ОНМК тесно ассоциировано с госпитальным гипергликемическим синдромом. При этом уровень гликированного гемоглобина наиболее тесно связан с уровнем постпрандиальной гипергликемии в вечерние часы (17 и 21 ч). Параметры гипергликемии имеют наибольший удельный вес в факторном анализе у больных с цереброваскулярными заболеваниями в сравнении с реовазографическими параметрами.

2. Гипергликемия связана с пульсовым и минутным кровенаполнением мозговых артерий, а гипергликемия, определяемая по уровню гликированного гемоглобина, в свою очередь, тесно связана с изменением тонуса магистральных артерий и с изменением тонуса артерий мелкого калибра и степенью нарушений венозного оттока. Вариант стационарной гипергликемии, включающий гипергликемию по высокому уровню HbA1c, является наиболее клинически тяжелым по шкале SSS.

Литература

1. Goldstein D.E., Little R.R., Lorenz R.A. et al. Tests of glycemia in diabetes // *Diabetes care*. 2004; 27: 1763–1773.
2. Ефимов А.С., Зуева Н.А., Тронько Н.Д., Скробонская Н.А. Малая энциклопедия врача-эндокринолога. Киев: Медкнига, 2007: 360 с.
3. Conner T.M. Hyperglycemia in the hospital setting: the case for improved control among non-diabetics // *Ann. Pharmacotherapy*. 2005; 39 (3): 492–501.
4. Lewis K., Kane S., Bobek M. et al. Intensive insulin therapy for critically ill patients // *Ann. Pharmacotherapy*. 2004; 38 (37): 1243–1251.
5. Королев В.А. Опыт и методология определения гликированного гемоглобина // *Лікарська справа / Врачебное дело*. 2010; 3 (63): 24–26.
6. Draznin B., Gilden J., Golden S.H. et al. Pathways to quality inpatient management of hyperglycemia and diabetes: a call to action // *Diabetes Care*. 2013; 36: 1807–1814.
7. American Diabetes Association. Standards of medical care in Diabetes – 2013 // *Diabetes Care*. 2013; 36: S11–S66.
8. Клиническая оценка лабораторных тестов: Пер. с англ. / Под ред. Н.У. Тица. М.: Медицина, 1986: 480 с.
9. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus / DCCT // *N. Engl. J. Med.* 1993; 329 (14): 977–986.
10. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) / UKPDS // *Lancet*. 1998; 352 (9131): 837–853.
11. The ADVANCE collaborative group. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes / The ADVANCE collaborative group // *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 2560–2572.
12. The action to control cardiovascular risk in diabetes study group. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes / The ACCORD // *N. Engl. J. M.* 2008; 358: 2545–2559.
13. Khaw K.T., Wareham N., Bingham S. et al. Preliminary communication: glycated hemoglobin, diabetes, and incident colorectal cancer in men and women: a prospective analysis from the Euro-pean prospective investigation into cancer-Norfolk study // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004; 13 (6): 915–919.
14. Королев В.А. Тактика применения гликированного гемоглобина у больных сахарным диабетом // *Современный научный вестник*. 2013; 30 (169): 100–115.
15. International Expert Committee Report on the Role of the A1c Assay in the Diagnosis of Diabetes // *Diabetes Care*. 2009; 32 (7): 1327–1334.
16. Галстян Г.Р. Международные рекомендации по исследованию уровня гликированного гемоглобина HbA1c как диагности-

ческого критерия сахарного диабета и других нарушений углеводного обмена // *Сахарный диабет*. 2010; 4: 57–61.

17. American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes // *Diabetes Care*. 2010; 33 (1): S11–S61.
18. Delamater A.M., Patino A.M., Schnieder K. et al. The glycosylated hemoglobin A1c test: what youths really know about it? [Abstract] // *Diabetes*. 2001; 50, suppl. 2: A390.
19. Ceriello A., Colagiuri S. International Diabetes Federation guideline for management of postmeal glucose: a review of recommendations // *Diabet. Med.* 2008; 25 (10): 1151–1156.
20. Vincenzi Jager A., Franco Maggi Tavares M. Novel approach for the analysis of glycated hemoglobin using capillary focusing with chemical mobilization // *J. Chromatogr.* 2003; 785 (2): 285–292.
21. Меньшиков В.В. Энциклопедия клинических лабораторных тестов: пер. с англ. Лабинформ, 1997: 960 с.
22. Управление качеством клинических лабораторных исследований: нормат. док. М., 2000: 151 с.
23. Scott J.F., Robinson G.M., French J.M. et al. Prevalence of admission hyperglycemia across clinical subtypes of acute stroke // *Lancet*. 1999; 353: 376–377.
24. Capes S.E., Hunt D., Malmberg K. Stress Hyperglycemia and Prognosis of Stroke in Nondiabetic and Diabetic Patients // *Stroke*. 2001; 32: 2426–2432.
25. Multicenter trial of hemodilution in ischemic stroke – background and study protocol / SSS Group // *Stroke*. 1985; 16 (5): 885–890.
26. Johnston S.C., Rothwell P.M.N., Nguyen-Huynt M.N. et al. Validation and refinement of scores to predict very early stroke risk after transient ischaemic attack // *Lancet*. 2007; 369 (9558): 283–292.
27. Luraschi P., Brambilla S., Mozzi R., Cattozzo G., Franzinila C. Monitoring analytical quality in routine glycohemoglobin measurements // *Clin. Chem.* 2002; 48: 1594–1597.
28. Парфенов В.А. Острый период ишемического инсульта: диагностика и лечение // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2009; 1: 5–12.
29. Cameron J.D., Pinto E., Bulpitt C.J. et al. The ageing of elastic and muscular arteries a comparison of diabetic and non – diabetic subject // *Diabetes Care*. 2003; 26: 2127–2132.
30. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. М.: Медицина, 1987: 386 с.
31. Scherntthamer G., Stummvole H.K., Muller M.U. Glycosylated Hb in chronic renal failure // *Lancet*. 1979; 1: 774.
32. Петрова Н.П. Сравнительная характеристика окислительного стресса у больных с инсультом и инфарктом миокарда: дисс. ... канд. мед. наук. М., 2008: 149 с.
33. Дедов И.И., Шестакова М.В. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. М., 2009: 103 с.
34. Skyler G.S. Diabetic complications. The importance of glucose control // *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 1996; 25 (2): 243–254.
35. Ricci Z., Cruz D., Ronco C. The RIFLE criteria mortality in a injury: A systematic review // *Kidney intern.* 2008; 73: 538–546.
36. De Frenzo R.A. Patogenesis of glucose intolerance in uremia // *Metabolism*. 1978; 27: 1866–1874.
37. Winkelmayer W.C., Owen W., Glynn R.J. et al. Preventive health care measures before and after start of renal replacement therapy // *J. Gen. Intern. Med.* 2002; 17 (8): 658–662.
38. Fluckiger R. Glycated Haemoglobin Review // *J. Chromatog.* 1988; 428: 279–292.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ И ПОЛИСОМНОГРАФИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПСИХОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ИНСОМНИИ

О.В. ТИХОМИРОВА, Е.В. БУТЫРИНА, Н.Н. ЗЫБИНА, М.Ю. ФРОЛОВА
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова»
МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Результаты работы основаны на обследовании 94 человек с хронической психофизиологической инсомнией и 41 человека контрольной группы. Группы обследованных лиц были сопоставимы по возрасту. У пациентов с психофизиологической инсомнией характерными изменениями сна оказались снижение общей продолжительности и эффективности сна за счет увеличения латентности наступления сна, увеличения времени бодрствования внутри сна. Была проведена стандартизация преаналитического этапа определения основного метаболита мелатонина, что позволило установить взаимосвязь нарушения структуры и качества сна со снижением ночного 6-оксиМТ.

Ключевые слова: инсомния, полисомнография, 6-сульфатоксимелатонин, лабораторная диагностика, преаналитический этап.

CLINICAL LABORATORY AND POLYSOMNOGRAPHIC DIAGNOSTICS OF PSYCHOPHYSIOLOGICAL INSOMNIA

O.V. TIKHOMIROVA, E.V. BUTIRINA, N.N. ZIBINA, M.JU. FROLOVA
Federal State Budget Institution "A. M. Nikiphorov All-Russia Center of emergency and radiation medicine" Ministry of emergency situations of Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Summary. The article presents the results of 94 patients observation, all of them having psychophysiological insomnia, and 41 healthy controls. All patients and controls were comparable by age. In patients with insomnia typical changes were decrease of general duration and efficacy of sleep and increase of latency of sleep coming, increase of the time of wake inside the sleep. The standartization of preanalytic stage of evaluation of melatonin main metabolite was performed. This gave possibility to find the links between structure and quality of sleep and decrease of nocturnal 6-oxymelatonin.

Key words: insomnia, polysomnography, 6-sulphatoxymelatonin, laboratory diagnostics, preanalytic stage.

Данные для корреспонденции

Зыбина Наталья Николаевна, д. б. н., профессор, заведующая отделом лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова» МЧС России; Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54, тел.: + 7 (921) -866-78-84, e-mail: zybina@inbox.ru

Актуальность исследования

Инсомния является одной из главных составляющих триады нарушений цикла «сон-бодрствование», включающей также гиперсомнию и парасомнию.

Инсомния определяется как повторяющиеся нарушения инициации, продолжительности, консолидации или качества сна, случающиеся несмотря на наличие достаточного количества времени и условий для сна и проявляющиеся нарушениями дневной деятельности.

По данным эпидемиологии, инсомния встречается у 28–45% популяции и в половине случаев является важной проблемой, требующей лечения. При этом 1,5–

3% популяции постоянно и 25–29% эпизодически принимают снотворные препараты [1, 2].

Учитывая распространенность инсомнии в популяции, понятна необходимость ее диагностики. Общепринятые критерии диагностики инсомнии разработаны на основе сбора анамнеза и использования специальных шкал. Единственным инструментальным методом диагностики является полисомнография, которая применяется редко.

Лабораторные методы диагностики используются чрезвычайно ограниченно. Это обусловлено недостаточ-

ным количеством сведений о молекулярных механизмах нарушений сна, трудностями методического характера, отсутствием сведений о диагностической значимости лабораторных параметров.

Важнейшую роль в регуляции биоритмов и, в частности, циркадного ритма играет мелатонин [3, 4]. Данные проводившихся исследований в отношении связи между содержанием ночного мелатонина и нарушениями сна противоречивы. Несмотря на общепринятое важное значение мелатонина в организации сна и наличие способов определения мелатонина в крови и его производных в моче, эти лабораторные показатели не используются в рутинной клинической практике при диагностике инсомнии, выборе терапии и контроле эффективности лечения.

Выбор медикаментозного лечения инсомнии определяется личным опытом врача, так как подходы к дифференцированной терапии, основанной на объективных критериях, не разработаны.

Проведение мета-анализа 19 клинических испытаний применения экзогенного мелатонина [5] доказало его эффективность в лечении инсомнии. В то же время результаты сопоставлений между экскрецией основного метаболита мелатонина — 6-сульфатоксимелатонина (6-оксиМТ) и инсомнией противоречивы. В работе Leger D. с соавт. [6] выявлено снижение экскреции 6-оксиМТ в ночной порции мочи у пациентов с инсомнией. В других исследованиях [7, 8] никакой зависимости между уровнем 6-оксиМТ и наличием инсомнии получено не было. Отсутствуют референтные значения для экскреции и концентрации 6-оксиМТ.

В связи с вышеперечисленным, представляется актуальным исследование содержания мелатонина и определение его диагностической значимости у лиц с психофизиологической инсомнией.

Цель исследования

Обосновать программу диагностики психофизиологической инсомнии на основании сопоставления результатов клинических данных, полисомнографических исследований и лабораторных показателей.

Материалы и методы исследования

Работа основана на обследовании 94 человек с хронической психофизиологической инсомнией в возрасте от 32 до 85 лет. Средний возраст составил 51 ± 13 лет. Контрольную группу ($n = 41$) составили здоровые добровольцы без субъективных нарушений сна в возрасте от 40 до 70 лет (средний возраст составил 46 ± 11 лет). Пациенты проходили обследование в клинике ВЦЭРМ им. А. М. Никифорова МЧС России в период с 2008 по 2012 год. Основная и контрольная группы были сопоставимы по возрасту. Значимых гендерных различий среди пациентов с психофизиологической инсомнией в различных возрастных группах выявлено не было. Критериями включения пациента в исследование были:

согласие больного на использование данных о его болезни в научных исследованиях, наличие жалоб на нарушения сна (нарушения инициации, поддержания, качества сна). Критериями исключения являлись значимые нарушения дыхания во сне (индекс апноэ/гипопноэ более 5), наличие периодических движений конечностями с индексом более 6 в час, обострения хронических заболеваний, наличие в анамнезе психического заболевания.

Обследование включало в себя:

1. *Сбор анамнеза.*
2. *Анкетирование.*
Анкета балльной оценки субъективных характеристик сна, анкета «скрининга апноэ во сне», шкала дневной сонливости Epworth, госпитальная шкала тревоги и депрессии (HADS).
3. *Полисомнографическое исследование.*
Проводили на приборе фирмы «NicoletOne» по стандартной методике. Регистрировали 6 каналов электроэнцефалограммы, окулограмму, подбородочную электромиограмму, ЭКГ. Фиксировались также ороназальный поток, дыхательные движения грудной и брюшной стенок, сатурация крови, шум дыхания. Параллельно в течение всей записи ночного сна (8 часов) проводилось видеомониторирование. Оценку фаз сна проводили по стандартной методике [9] с модификацией: согласно международной классификации расстройств сна, переизданной в 2005 г., 3 и 4 стадии NREM сна объединены в одну — дельта-сон. По данным полисомнографии оценивали латентность наступления устойчивого сна (LPS), общую продолжительность сна (TST) и его эффективность, время бодрствования внутри сна (WDS), длительность и процентное содержание отдельных фаз сна, общее количество активаций и их индекс (количество в час сна), индекс периодического движения конечностями и индекс апноэ/гипопноэ (количество эпизодов нарушения дыхания в час сна).
4. *Лабораторная диагностика.*
Лабораторное обследование включало: определение основного метаболита мелатонина — 6-сульфатоксимелатонина (6-оксиМТ) в дневной и ночной порциях мочи. Материалом для исследования содержания 6-сульфатоксимелатонина служила моча обследованных лиц. К ночной порции мочи относили мочу, собранную во время ночных пробуждений, и утреннюю порцию мочи, к дневной порции — все остальные порции мочи. 6-оксиМТ определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, ELISA (Buhlmann Laboratories AG, Швейцария). Результаты для концентрации 6-оксиМТ выражены в нг/мл, для ночной экскреции 6-оксиМТ в мкг/ночь, для дневной экскреции 6-оксиМТ в мкг/день, для суточной экскреции 6-оксиМТ в мкг/24 ч.
Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 8.0».

Результаты исследования

Сопоставление субъективных характеристик сна выявило достоверное нарушение всех исследуемых показателей в основной группе по сравнению с контролем (табл. 1).

В основной группе отмечалось значимое ухудшение субъективных характеристик сна и снижение дневной активности за счет увеличения дневной сонливости.

Хронические стрессовые ситуации и тревожно-депрессивные расстройства являются основной причиной развития психофизиологической инсомнии.

Сопоставление данных по уровню тревоги и депрессии в основной группе по сравнению с контролем выявило достоверно значимое увеличение уровня тревоги и депрессии у пациентов с психофизиологической инсомнией (табл. 2).

Сопоставление объективных характеристик сна, полученных при полисомнографии, выявило достоверное нарушение большинства исследуемых показателей в основной группе по сравнению с контролем (табл. 3).

Таблица 1. Сравнение показателей субъективных характеристик сна в основной и контрольной группах

Показатель	Группа				P
	Контроль, n = 41		Основная, n = 94		
	M	SD	M	SD	
Анкета субъективных характеристик сна, балл	22,6	2,4	16,7	3,4	< 0,001
Эпвортская шкала, балл	6,0	4,5	7,5	3,8	< 0,05

Таблица 2. Сравнительная характеристика между контролем и основной группой по уровню тревоги и депрессии

Показатель	Группа				P
	Контроль, n = 41		Основная, n = 94		
	M	SD	M	SD	
Госпитальная шкала, балл:					
Тревога	5,2	3,9	9,3	3,9	< 0,001
Депрессия	3,5	3,1	6,7	3,3	< 0,001

Таблица 3. Сравнительная оценка объективных характеристик сна между контролем и основной группой

Показатель	Группа				P
	Контроль, n = 41		Основная, n = 94		
	M	SD	M	SD	
TST, мин	422,3	47,4	347,9	83,6	< 0,001
TST/TIB · 100,%	87,7	6,2	75,5	13,0	< 0,001
LPS, мин	15,3	12,4	46,5	54,3	< 0,001
WDS, мин	39,4	25,9	79,4	46,2	< 0,001
Стадия сна,%					
I,%	3,4	2,8	9,6	9,8	< 0,001
II,%	57,0	7,7	59,2	10,5	—
Дельта сон,%	18,8	5,8	16,9	9,0	—
БДГ,%	20,6	5,6	15,5	6,8	< 0,001
Количество пробуждений	15,7	8,1	20,2	8,6	< 0,05
Индекс активаций	4,3	3,5	6,5	4,5	< 0,05

У пациентов с психофизиологической инсомнией характерными изменениями сна оказались снижение общей продолжительности и эффективности сна за счет увеличения латентности наступления сна, увеличения времени бодрствования внутри сна, снижения процентного содержания БДГ.

У пациентов основной группы было проведено сопоставление субъективных и объективных характеристик сна в зависимости от возраста. С этой целью пациенты были разделены по возрастам на две группы. В первую группу вошли пациенты в возрасте от 22 до 54 лет, во вторую группу вошли пациенты в возрасте от 55 до 85 лет. Достоверные различия были получены только по эффективности сна ($p < 0,01$) и по времени бодрствования внутри сна ($p < 0,01$). Эффективность сна достоверно ниже, а время бодрствования внутри сна больше были в возрастной группе 55–80 лет.

Результаты проведенного корреляционного анализа показали, что уровень тревоги преимущественно влияет на процессы инициации сна ($r = 0,24$, $p < 0,05$), а депрессия — на процессы поддержания сна ($r = -0,25$, $p < 0,05$). Субъективная оценка качества сна отражает только общее время сна ($r = 0,349$, $p < 0,05$) и латентность наступления сна ($r = -0,288$, $p < 0,05$) и является не информативной для оценки времени бодрствования внутри сна и соотношения длительности фаз и стадий сна, что доказывает необходимость совместного использования анкетирования и полисомнографии для диагностики психофизиологической инсомнии.

При лабораторной диагностике психофизиологической инсомнии основное внимание уделялось оценке содержания 6-оксиМТ в дневной и ночной порциях мочи.

Учитывая выраженную зависимость синтеза мелатонина от времени суток, принято оценивать концентрацию или экскрецию 6-сульфатоксимелатонина отдельно в ночной и дневной порциях мочи.

Анализ исследований, посвященных изучению синтеза мелатонина у пациентов с инсомнией, показал отсутствие стандартизации времени сбора ночной и дневной порций мочи. Мы предложили вариант преаналитического этапа. Особенностью предложенного нами способа сбора мочи являлось отнесение к ночной порции всех порций мочи во время сна и первой утренней порции мочи, а к дневной — всех остальных порций, вне зависимости от времени, в отличие от ранее предлагаемых способов, включавших вечернюю мочу (с 20:00 или с 22:00) в ночную порцию.

Было проведено сопоставление исследуемых лабораторных показателей (определение основного метаболита мелатонина — 6-сульфатоксимелатонина (6-оксиМТ) в дневной и ночной порциях мочи) у пациентов с психофизиологической инсомнией и контрольной группой.

В связи с тем, что распределение показателей 6-оксиМТ как в основной, так и в контрольной группе отличается от нормального, сравнение показателей проводилось с помощью критерия Манна–Уитни и 2-стороннего точного критерия Фишера (табл. 4).

Таблица 4. Сравнительная характеристика показателей 6-оксиМТ у пациентов с психофизиологической инсомнией и контрольной группы

Показатель	Группа				P (Манн–Уитни)
	Контроль, n = 41		Основная, n = 39		
	Медиана	m	Медиана	m	
Концентрация 6-оксиМТ в моче, ночь (нг/мл)	20,9	3,4	17,2	2,4	< 0,05
Концентрация 6-оксиМТ в моче, день (нг/мл)	6,5	1,4	6,9	2,3	—
Отношение концентрации 6-оксиМТ в моче ночь/день	3,2	2,9	2,4	0,6	—
Экскреция 6-оксиМТ, ночь (мкг/ночь)	10,9	2,5	7,0	1,4	—
Экскреция 6-оксиМТ, день (мкг/день)	5,8	1,4	5,9	4,6	—
Отношение экскреции 6-оксиМТ ночь/день	1,6	0,7	1,0	0,5	—
Суточная экскреция 6-оксиМТ (мкг/24 часа)	21,2	2,9	12,2	2,9	< 0,05

Примечание: m — стандартная ошибка.

Из представленной таблицы видно, что концентрация ночного мелатонина и экскреция мелатонина суточной мочи значимо меньше в основной группе.

Полученные данные свидетельствуют о сниженном синтезе ночного мелатонина у пациентов с инсомнией. Референтные значения экскреции и концентрации 6-оксиМТ не определены в связи с отсутствием стандартизации определения данного метаболита в моче при инсомнии.

В нашем исследовании диапазон колебаний экскреции 6-оксиМТ в основной группе составил 1,4–33,4 мкг/ночь, в контроле 1,6–79,4 мкг/ночь. Обращал на себя внимание факт значительных индивидуальных колебаний ночной экскреции 6-оксиМТ как в основной группе, так и в группе контроля. Анализ значений экскреции 6-оксиМТ в ночной порции мочи показывает, что как в основной, так и в контрольной группе распределение отличается от нормального (рис. 1).

Такой разброс значений затрудняет определение референтного интервала.

В качестве предварительных данных мы считали сниженными значения 6-окси МТ, соответствующие 1-й квартили контрольной группы. Результаты исследования показывают, что низкая ночная экскреция мелатонина (до 5,8 мкг) и низкая концентрация ночного 6-окси МТ (до 13,5 нг/мл), соответствующие 1-й квартили контрольной группы, встречаются у пациентов с инсомнией значительной чаще ($p < 0,01$). При этом показатель концентрации и соотношение ночной экскреции к дневной имеет большую диагностическую значимость, чем показатель ночной экскреции (табл. 5).

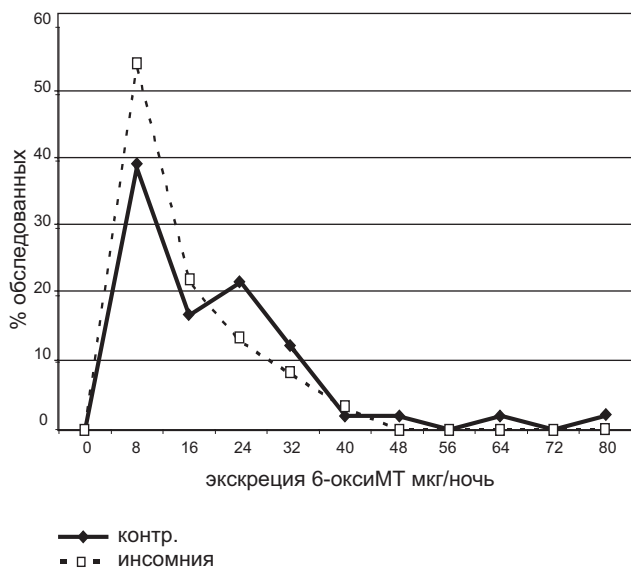


Рис. 1. Распределение пациентов основной и контрольной групп в зависимости от экскреции 6-оксиМТ в ночной порции мочи

Таким образом, для пациентов с хронической инсомнией важное диагностическое значение имеет определение концентрации и экскреции 6-оксиМТ в ночной порции мочи, а также отношения экскреции ночного к экскреции дневного 6-оксиМТ. Результат будет зависеть от времени сбора мочи, в связи с чем стандартизация преаналитического этапа обязательна.

Для определения возможной связи эмоционально-волевых нарушений с уровнем мелатонина нами был проведен анализ содержания 6-оксиМТ у пациентов

Таблица 5. Распределение пациентов с инсомнией в зависимости от показателей 6-оксиМТ в моче по квартилям контрольной группы

Квартиль	Концентрация ночного 6-оксиМТ (нг/мл)		Экскреция ночного 6-оксиМТ (мкг)		Отношение экскреции ночного к экскреции дневного 6-оксиМТ	
	Значение в группе контроля	Количество пациентов с инсомнией (%)	Значение в группе контроля	Количество пациентов с инсомнией (%)	Значение в группе контроля	Количество пациентов с инсомнией (%)
Q1	13,5	44 ***	5,8	35	0,72	43 ΔΔΔ
Q2	20,9	15	10,9	24	1,58	13
Q3	38,6	31	21,3	27	3,18	22
Q4	88,7	10	79,4	14	20,1	22

Примечание: *** — ($p < 0,001$) — достоверность различий между частотой снижения экскреции и концентрации ночного 6-оксиМТ; ΔΔΔ — ($p < 0,001$) — достоверность различий между частотой снижения экскреции и отношения экскреции ночного 6-оксиМТ к дневному.

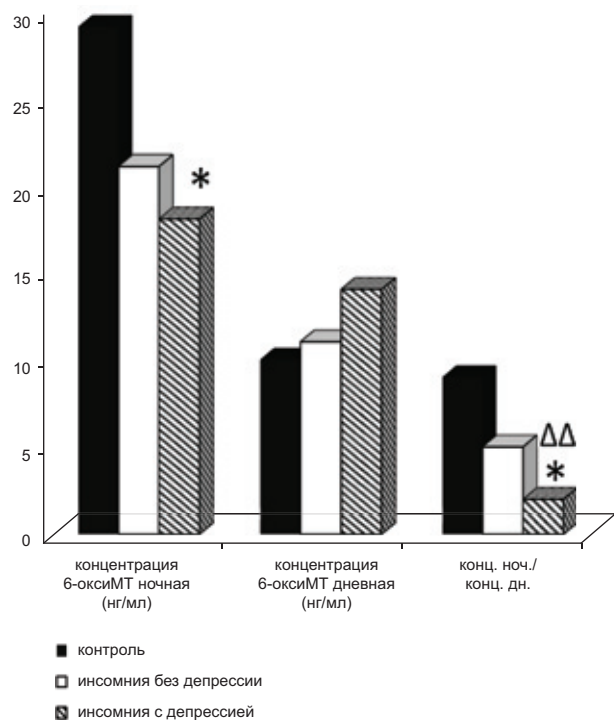


Рис. 2. Сопоставление показателей у пациентов с психофизиологической инсомнией на фоне депрессии с пациентами без депрессии и с контрольной группой по уровню концентрации 6-оксиМТ в ночной и дневной порциях мочи (* достоверность различий с контрольной группой, $p < 0,05$; $\Delta\Delta$ достоверность различий с группой пациентов с инсомнией без депрессии, $p < 0,01$)

с клинически значимой тревогой и депрессией. Значимых связей выраженности тревоги со значениями 6-оксиМТ в моче выявлено не было.

У пациентов с инсомнией в сочетании с клинически значимой депрессией было выявлено значимое снижение уровня концентрации 6-оксиМТ в ночной порции мочи по сравнению с контрольной группой и значимое снижение отношения концентрации ночного 6-оксиМТ к концентрации дневного 6-оксиМТ по сравнению с контрольной группой и группой пациентов с инсомнией без признаков депрессии (рис. 2).

Для выявления зависимости между исследуемыми лабораторными показателями и параметрами сна был проведен корреляционный анализ. Выявлено, что снижение экскреции 6-оксиМТ в ночной порции мочи коррелирует со снижением продолжительности глубокого дельта сна ($r = 0,44, p < 0,05$) и БДГ сна ($r = 0,34, p < 0,05$).

Обсуждение результатов

В задачи нашего исследования входил анализ имеющихся лабораторных методов определения эндогенного мелатонина, выявление причин крайне редкого использования этих показателей в клинической практике, выборе оптимального метода, стандартизации его прове-

дения и оценке клинической значимости предложенных лабораторных параметров в диагностике инсомнии.

Вследствие выраженных почасовых колебаний уровня мелатонина в крови и быстрого распада мелатонина (период полувыведения не более 50 мин), объективная оценка содержания мелатонина возможна только при постановке катетера и многократном в течение суток заборе крови, что не может быть рекомендовано для широкого применения в клинической практике. В связи с этим наиболее широко в настоящее время применяется оценка содержания основного метаболита мелатонина — 6-сульфатоксимелатонина в моче. Учитывая выраженную зависимость синтеза мелатонина от времени суток, принято оценивать концентрацию или экскрецию 6-сульфатоксимелатонина отдельно в ночной и дневной порциях мочи. Анализ исследований, посвященных изучению синтеза мелатонина у пациентов с инсомнией, показал отсутствие стандартизации времени сбора ночной и дневной порций мочи. Так, в исследованиях Lushington с соавт. [7, 8] ночную и дневную порции мочи собирали в периоды 20.00–08.00 и 08.00–20.00 соответственно. В результате исследований не было получено никаких различий между экскрецией 6-сульфатоксимелатонина у пациентов с инсомнией и контрольной группой. В противоположность этому, в работе Leger D. с соавт. [6], в которой представлены результаты обследования 517 пациентов с инсомнией в возрасте старше 55 лет, было выявлено значимое снижение экскреции 6-сульфатоксимелатонина в ночной порции мочи у пациентов с инсомнией по сравнению с контролем — 9,0 (8,3) и 18,1 (12,7) мкг за ночь соответственно, ($p < 0,05$), при этом сбор ночной и дневной порций мочи осуществлялся в периоды 22.00–10.00 и 10.00–22.00. В проведенном нами исследовании также получены результаты, подтверждающие снижение синтеза ночного мелатонина у пациентов с инсомнией. Особенностью предложенного нами способа сбора мочи являлось отнесение к ночной порции всех порций мочи во время сна и утренней порции мочи, а к дневной порции мочи — всех остальных порций вне зависимости от времени. Такой подход мы считаем принципиальным, так как в этом случае в ночную порцию мочи не может попасть часть мочи, собранная перед сном и отражающая секрецию мелатонина во второй половине дня. Данную модификацию преаналитического этапа метода мы предложили, основываясь на результатах Hajaks и соавт. [14], которые при исследовании содержания плазменного мелатонина с интервалом в 1 час у пациентов с инсомнией и здоровых испытуемых показали, что у пациентов с инсомнией пиковое значение мелатонина отмечается рано вечером, а у здоровых испытуемых в середине ночи. Таким образом, значимым для инсомнии было не только снижение пикового значения синтеза мелатонина, но и выраженный сдвиг этого пика с ночного на вечернее время. Следовательно, при сборе ночной порции мочи с 20.00 появляется риск получения

нормальных показателей экскреции ночного мелатонина у пациентов с инсомнией за счет вечернего пика, что могло быть одной из причин отсутствия различий между пациентами с инсомнией и здоровым контролем в исследованиях Lushington с соавт. [6, 7]. В нашей работе получены данные, доказывающие наличие связи между синтезом ночного мелатонина и характеристиками сна. Данный результат в значительной степени может быть связан с изменением преаналитического этапа сбора мочи, предложенного нами.

Сложность в интерпретации полученных данных по экскреции мелатонина у пациентов с инсомнией связана также с большим разбросом индивидуальных значений как среди пациентов с инсомнией, так и среди контрольной группы. Наличие у ряда испытуемых контрольной группы низких значений экскреции мелатонина и высоких показателей у некоторых пациентов с инсомнией отмечали многие авторы [14, 15, 16, 17]. Так, в исследовании R. Mahberg [18] авторы не получили каких-либо корреляций между полисомнографическими параметрами у пациентов с инсомнией и экскрецией 6-оксиМТ. Авторы делают вывод о неэффективности использования показателей экскреции 6-оксиМТ для оценки качества сна вследствие 20-кратных различий в индивидуальных колебаниях экскреции 6-оксиМТ, полученных в данном исследовании.

В нашем исследовании также выявлены значительные индивидуальные колебания экскреции 6-оксиМТ у пациентов с инсомнией (от 1,4 до 33,4 мкг/ночь) и у здоровых испытуемых (от 1,6 до 79,4 мкг/ночь), а также значимые отличия распределения от нормального. Важным и сложным в связи с этим становится определение нормативных значений экскреции мелатонина. Единственным исследованием, где обсуждаются нормативные показатели для экскреции 6-оксиМТ, является работа Leger с соавт. [6], в которой предложено считать нормой диапазон от 2,5 до 97,5 перцентилей по логарифмической шкале, что составило от 8 до 56 мкг для пациентов старше 55 лет. Предложенный нами вариант нижней границы нормы по первой квартили (6 мкг) сопоставим с нормативным значением в работе Leger с соавт. Определение референтных значений для экскреции 6-оксиМТ представляется важным, так как именно этот показатель позволит выделить пациентов с вариантом психофизиологической инсомнии, в развитии которой существенную роль сыграло снижение синтеза мелатонина. Эти данные послужат основанием для определения дополнительных показаний к назначению мелатонина при лечении инсомнии.

Многочисленные исследования показали снижение синтеза мелатонина во время приема бета-блокаторов, противовоспалительных средств, бензодиазепинов, некоторых антидепрессантов [17, 19, 20, 21, 22, 23], которые часто назначаются пациентам с инсомнией в связи с имеющейся у них сопутствующей соматической патологией. У пациентов с сочетанием кардиоваскулярной патоло-

гии с инсомнией при использовании перечисленных выше препаратов диагностика экскреции 6-оксиМТ приобретает добавочное значение, так как известно, что снижение синтеза мелатонина не только связано с развитием инсомнии, но и ассоциировано с риском развития сахарного диабета и артериальной гипертензии [6]. Диагностика снижения 6-оксиМТ у этих пациентов и назначение мелатонина в случае его снижения будут иметь значение для лечения как инсомнии, так и кардиоваскулярного заболевания.

Полученные результаты инструментально-лабораторного обследования позволяют считать снижение экскреции и концентрации 6-оксиМТ в ночной порции мочи важным дополнительным критерием, позволяющим выделить вариант развития психофизиологической инсомнии.

Выводы

Субъективная оценка качества сна отражает только общее время сна ($r = 0,35$; $p < 0,05$) и латентность наступления сна ($r = -0,29$; $p < 0,05$) и является неинформативной для оценки времени бодрствования внутри сна и соотношения длительности фаз сна. Для пациентов с психофизиологической инсомнией характерным является повышение уровня тревоги (57%) и депрессии (40%). Уровень тревоги преимущественно влияет на процессы инициации сна ($r = 0,24$; $p < 0,05$), а уровень депрессии на процессы поддержания сна ($r = -0,25$; $p < 0,05$).

При проведении лабораторного исследования у пациентов с психофизиологической инсомнией необходимо относить к ночной порции мочу, собранную во время ночных пробуждений, и утреннюю порцию мочи. Ориентировочным показателем сниженного синтеза ночного мелатонина следует считать снижение экскреции 6-оксиМТ ниже 5,8 мкг, снижение концентрации 6-оксиМТ в ночной порции мочи ниже 13,5 нг/мл, снижение значения отношения экскреции ночного к экскреции дневного 6-оксиМТ ниже 0,72.

Снижение ночного 6-оксиМТ связано с нарушением структуры и качества сна. Это проявляется в виде увеличения I фазы сна, снижения продолжительности дельта-сна ($r = 0,44$, $p < 0,05$) и БДГ сна ($r = 0,34$, $p < 0,05$).

Литература

1. Kiley J. Insomnia research and future opportunities // *Sleep*. 1999; 22 (1): 344–345.
2. Ohayon M. M. Epidemiology of insomnia: What we know and what we still need to learn // *Sleep med. rev.* 2002; 6 (2): 97–111.
3. Ковальзон В. М. Основы сомнологии: Физиология и нейрохимия цикла «бодрствование — сон». М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2012: 239 с.
4. Zhdanova I. V., Wurtman R. J. Efficacy of melatonin as a sleep-promoting agent // *J. Biol. Rhythms*. 1997; 12 (6): 644–650.
5. Hirshkowitz M., Wilcox Rose M. et al. Neurotransmitters, Neurochemistry and the Clinical Pharmacology of Sleep // *Sleep Disorder Medicine*, 3rd ed., 2009: 67–79.

6. *Van Praag H. M.* Depression, suicide, and serotonin metabolism in the brain // *Neurobiology of mood disorders* / R. M. Post, J. C. Ballenger. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984; 1: 601–618.
7. *Gibbons R. D., Davis J. M.* Consistent evidence for a biological subtype of depression characterized by low CSF monoamine levels // *Acts psychiatr. scand.* 1986; 74: 8–12.
8. *Meltzer H. Y., Lowy M. T.* The serotonin hypothesis of depression // *Psychopharmacology: the third generation of progress* / H. Y. Meltzer. New York: Raven Press, 1987: 513–526.
9. *Ferracioli Oda E., Qawasmi A., Bloch M. H.* Meta-analysis: melatonin for the treatment of primary sleep disorders // *Plos one*, 2013: e63773 (in process).
10. *Leger D., Laudon M., Zisapel N.* Nocturnal 6-sulfatoxymelatonin excretion in insomnia and its relation to the response to melatonin replacement therapy // *Am. J. med.* 2004; 15; 116 (2): 91–95.
11. *Lushington K., Lack L., Kennaway D. J. et al.* 6-Sulfatoxymelatonin excretion and self-reported sleep in good sleeping controls and 55–80-year-old insomniacs // *J. sleep res.* 1998; 7: 75–83.
12. *Lushington K., Dawson D., Kennaway D. J. et al.* The relationship between 6-sulphatoxymelatonin and polysomnographic sleep in good sleeping controls and wake maintenance insomniacs, aged 55–80 years // *J. sleep res.* 1999; 8: 57–64.
13. *Rechtschaffen A., Kales A.* A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects / Los Angeles: Brain Information Service / Brain Research Institute, University of California at Los Angeles, 1968.
14. *Hajak G., Rodenbeck A., Staedt J. et al.* Nocturnal plasma melatonin excretion in patients suffering from chronic primary insomnia // *J. pineal res.* 1995; 19: 116–122.
15. *Haimov I., Laudon M., Zisapel N. et al.* Sleep disorders and melatonin rhythms in elderly people // *Brit. med. j.* 1994; 309: 167.
16. *Lynch H. L., Wurtman R. J., Moskowitz L. A. et al.* Daily rhythm in human urinary melatonin // *Science.* 1975; 187: 169–171.
17. *Shochat T., Haimov I., Lavie P.* Melatonin — the key to the gate of sleep // *Ann. med.* 1998; 30: 81–87.
18. *Mahlberg R., Tilmann A., Salewski L. et al.* Normative data on the daily profile of urinary 6-sulfatoxymelatonin in healthy subjects between the ages of 20 and 84 // *Psychoneuroendocrinology.* 2006; 31 (5): 634–641.
19. *Brismar K., Hylander B., Eliasson K. et al.* Melatonin secretion related to side — effects of beta-blockers from the central nervous system // *Acta med. scand.* 1988; 223: 525–530.
20. *Cowen P. J., Bevan J. S., Gosden B. et al.* Treatment with adrenoceptor blockers reduces plasma melatonin concentration // *Brit. J. clin. pharmacol.* 1985; 19: 258–260.
21. *Murphy P., Myers B. L., Badia P.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs alter body temperature and suppress melatonin in humans // *Physiol. behav.* 1996; 59: 133–139.
22. *Myers B. L., Badia P.* Factors affecting endogenous melatonin levels // *Sleep res.* 1993; 22: 2.
23. *Van den Heuvel C. J., Reid K. J., Dawson D.* Effect of atenolol on nocturnal sleep and temperature in young men: reversal by pharmacological doses of melatonin // *Physiol. behav.* 1997; 61: 795–802.

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ЧЕЛОВЕКА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ, СОДЕРЖАЩИХ МАЛОЕ КОЛИЧЕСТВО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА, С ПОМОЩЬЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ DNA IQ (PROMEGA)

И. В. КОРНИЕНКО^{1, 2}, Т. Г. ФАЛЕЕВА^{1, 3}

- ¹ Филиал № 2 федерального государственного казенного учреждения «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Министерства обороны Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону
- ² Южный федеральный университет, научная лаборатория «Идентификация объектов биологического происхождения», г. Ростов-на-Дону
- ³ Ростовский государственный медицинский университет, кафедра судебной медицины с курсом правоведения, г. Ростов-на-Дону

Резюме. Проведены исследование влияния различных температурных воздействий и оценка оптимальных условий деструкции клеточных структур на качество препаратов ДНК при инкубации биологических объектов в присутствии высоких концентраций катионов гуанидиния. Заметный гидролиз высокомолекулярной ДНК происходил после 30-минутной инкубации при температуре +60 °С. При температурах +90...+100 °С следов высокомолекулярной ДНК практически не остается. Оптимальный температурный диапазон инкубации без заметной деполимеризации препаратов ДНК лежит в пределах +30...+40 °С.

Ключевые слова: выделение ДНК, деградация ДНК, спектрофотометрия, электрофорез ДНК, ПЦР «в реальном времени».

OPTIMIZATION OF HUMAN DNA ISOLATION FROM BIOLOGICAL SAMPLES WITH LOW LEVEL OF GENETIC MATERIAL USING THE DNA IQ KIT (PROMEGA)

I. V. KORNIENKO^{1, 2}, T. G. FALEEVA^{1, 3}

- ¹ Federal governmental organization Branch N 2 «The 111 Main Governmental Center for forensic medical and criminalistic examinations», Ministry of Defence of Russian Federation, Rostov-on-Don
- ² Southern Federal University, Scientific laboratory «Biological Object Identification», Rostov-on-Don
- ³ The Rostov State medical university, chair of forensic medicine with a course of jurisprudence, Rostov-on-Don

Summary. The effect of different temperature conditions on the qualitative characteristics of DNA preparations has been studied. Optimal conditions for destruction of cellular structures at incubation of biological samples in the presence of high concentrations of guanidine cations have been estimated. It was observed that 30 min incubation at 60 °C caused considerable hydrolysis of high-molecular weight DNA. After incubation at 90–100 °C, little traces of high-molecular weight DNA were found. Optimal temperature diapason, at which no considerable depolymerization of DNA preparations took place, was found to lie within the range of 30–40 °C.

Key words: DNA extraction, DNA degradation, spectrophotometric analysis, DNA electrophoresis, real-time PCR.

Данные для корреспонденции

Корниенко Игорь Валериевич, д. б. н. (специальность — 14.00.46), врач — судебно-медицинский эксперт, заведующий отделением судебной медико-криминалистической идентификации (молекулярно-генетической) филиала № 2 ФГКУ «111 ГГЦСМиКЭ» МО РФ
344000, г. Ростов-на-Дону, ул. Лермонтовская, 60, тел./факс: (863) 278-36-26;
заведующий научной лабораторией «Идентификация объектов биологического происхождения» Южного федерального университета, 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, тел. (863) 294-32-83, e-mail: ikornienko@yandex.ru

Введение

Высокая токсичность и сложность утилизации реагентов отрицательно сказались на популярности фенол-органической экстракции ДНК, и в настоящее время в большинстве лабораторий она заменена другими методами, такими как нуклеосорбция с помощью диоксида кремния (силики) [1], реализованными в большинстве коммерческих наборов. Одним из таких наборов реагентов является система для выделения ДНК «DNA IQ™» (производства фирмы «Promega»), при помощи которой можно получить высокоочищенные препараты ДНК. Экстракция включает в себя лизис клеток хаотропными компонентами набора с последующим связыванием ДНК сорбентом на основе кремнезема (silica matrix), связанным с магнитными частицами и обладающим высокой аффинностью к нуклеиновым кислотам. Липиды и белки, имеющие умеренное сродство к силике, легко удаляются в процессе последовательных промывок. Процедура выделения состоит из нескольких этапов, одним из которых является высокотемпературная инкубация (в течение 30 мин при +70 °С) биологического материала для дезинтеграции клеточных структур, растворения липидов и денатурации белков.

Нуклеиновые кислоты являются трудным для работы материалом. Они чувствительны к расщеплению ферментами-нуклеазами, не терпят экстремальных значений pH и температуры. При этом, согласно нашему экспертному опыту, работа со сверхмалым количеством биологического материала (например, пятнышко крови диаметром в доли миллиметра, отпечаток пальца и т. п.) всегда сопряжена с риском значительных потерь ДНК, либо деградацией полинуклеотидных цепей в результате гидролиза фосфодиэфирных связей во время процедуры экстракции.

Несмотря на то, что молекулы ДНК в клетках человека большую часть времени имеют определенный фиксированный размер, каким бы способом они не выделялись, экстракты ДНК представляют собой смеси полимеров различного молекулярного веса вследствие гидродинамических разрушений в процессе выделения, а также вследствие сопутствующего выделению распада, ферментативного или неферментативного.

Учитывая, что скорость гидролиза фосфодиэфирных связей ДНК имеет прямую зависимость от температуры, целью настоящей работы явилось исследование влияния различных температурных воздействий на качество получаемых препаратов ДНК, а также выбор оптимальных условий деструкции клеточных структур при инкубации биологических объектов в присутствии хаотропных агентов. Задачи исследования: оценка влияния различных температурных воздействий на степень деградации ДНК человека, а также отработка оптимальных условий выделения ДНК в присутствии высоких концентраций (6 М) гуанидин тиоцианата.

Материалы и методы

В качестве генетического материала использовали стандартную ДНК K562 (Promega) в концентрациях 0,540 и 50 нг/мкл, а также буккальный эпителий и кровь 24 добровольцев. Забор слюны и крови осуществляли натощак. Для консервации крови, предотвращения ее свертывания и улучшения осаждения лейкоцитов в кровь при взятии добавляли антикоагулянт цитрат натрия (3,8%-й раствор в соотношении 1 : 9). Удаление эритроцитов из цельной крови осуществляли путем их гемолиза 40-кратным объемом дистиллированной воды, перемешивали 30–40 секунд, после чего восстанавливали осмотическое давление, приливая соответствующее количество 10-кратного концентрата забуференного физиологического раствора (9 частей 1,5 М NaCl и 1 часть 1,5 М фосфатного буфера. 1,5 М NaCl: 87,7 г NaCl в 1 л раствора; 1,5 М фосфатный буфер: 29,6 мл раствора KH_2PO_4 (90,73 г/л) смешивали с 70,4 мл раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (118,7 г/л)). Лейкоциты осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут с помощью центрифуги Eppendorf 5702 (ротор F-35–30–17). Гемолиз с использованием дистиллированной воды был выбран, поскольку предполагает менее длительное воздействие на клетки и практически мгновенное полное снятие гипотонического воздействия путем прибавления 10-кратного концентрата физиологического раствора [2].

Выделение ДНК осуществляли согласно стандартному протоколу [3], при различных температурах и сроках инкубации в лизирующем буфере. Температурную инкубацию осуществляли в термощейкере Thermomixer compact (Eppendorf) при 900 об/мин.

Качественную и количественную оценку препаратов ДНК проводили с использованием методов УФ-спектрофотометрии, электрофореза в геле агарозы и ПЦР «в реальном времени».

Спектрофотометрический анализ препаратов ДНК проводили с помощью прибора «NanoDrop 1000» (Thermo Scientific).

Горизонтальный электрофорез молекул ДНК проводили в 1% геле агарозы с использованием TBE-буфера (89 мМ триса (2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол), 89 мМ борной кислоты, 2 мМ ЭДТА) в течение 40 минут при напряженности электрического поля 7 В/см. Визуализацию агарозного геля с разделенными фрагментами ДНК, ассоциированными с бромистым этидием, проводили в проходящих ультрафиолетовых лучах с помощью системы видеоизображения ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

ПЦР «в реальном времени» проводили с помощью набора реагентов «aXY-Детект», основанного на количественной оценке фрагментов генов β -актина и амелогенина (производства «Синтол») с использованием термоциклера iCycler iQ5 (Bio-Rad) [4].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы STADIA

[5]. О достоверности отличий показателей судили по величине *t*-критерия Стьюдента для прямых разностей сопряженных данных [6]. Статистически достоверными считали отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p < 0,05$. Наличие линейной корреляции между признаками оценивали с использованием коэффициентов корреляции, достоверность которых проверяли с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Полученные результаты и их обсуждение

Первым этапом нашего исследования было изучение влияния температуры на стабильность препаратов ДНК. Для этого нами была проведена инкубация восьми препаратов ДНК К562 (в пяти параллелях) в деионизованной воде в течение 30 минут в температурном диапазоне от 30 до 100 °С с интервалом 10 °С. После инкубации препараты ДНК оставляли при температуре 20–22 °С на 30 минут перед проведением электрофореза. Результаты эксперимента представлены на рисунке 1.

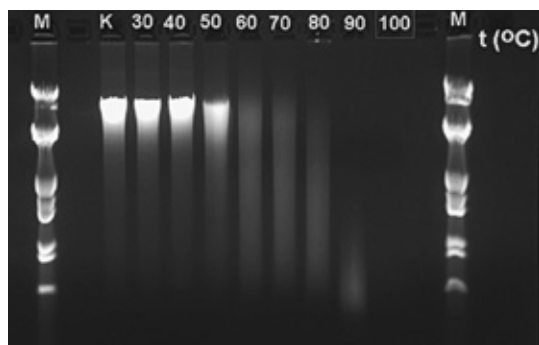


Рис. 1. Результаты электрофореза суммарной фракции нуклеиновых кислот К562 (50 нг/мкл) в 1%-м геле агарозы

Цифры от 30 до 100 обозначают температуру в Цельсиях, при которой происходила инкубация водных растворов ДНК К562. В районе между полосами 21226 и 5148 отчетливо видна фракция митохондриальной ДНК (мтДНК) размером 16569 нуклеотидных пар.

Молекулярный размер полос размерного стандарта (ДНК фага λ, обработанной рестриктазами *EcoRI* и *HindIII*): 21226 н. п. (нуклеотидных пар), 5148 н. п., 4268 н. п., 3530 н. п., 2027 н. п. и 1904 н. п. (визуализируются как одна полоса в геле), 1584 н. п. и 1375 н. п. (визуализируются как одна полоса в геле), 947 н. п., 831 н. п.

Из рисунка 1 видно, что заметная деполимеризация высокомолекулярной ДНК происходила уже при температуре +60 °С. А при температурах +90...+100 °С следов высокомолекулярной ДНК практически не оставалось. Оптимальный температурный диапазон инкубации без заметной деполимеризации препарата ДНК лежал в пределах +30...+40 °С. Полученные данные позволили нам установить оптимальную температуру инкубации высокомолекулярной ДНК в +30...+40-градусном интервале.

Для качественной оценки различных температурных условий сравнивали препараты ДНК, выделенные из буккального эпителия и лейкоцитов крови при рекомендованной производителем температуре инкубации

(+70 °С) и при +37 °С. Инкубацию проводили в течение 30 минут в 250 мкл лизирующем буфере DNA IQ™ (Promega) с добавлением 3 мкл 1 М ДТТ и 7 мкл протеиназы К (10 мг/мкл).

При сравнении результатов электрофореза в геле агарозы препаратов суммарной ДНК видно, что температура инкубации в лизирующем буфере, равная +37 °С, является наиболее оптимальной для экстракции высокомолекулярной ДНК как из клеток буккального эпителия, так и из лейкоцитов крови (рис. 2).

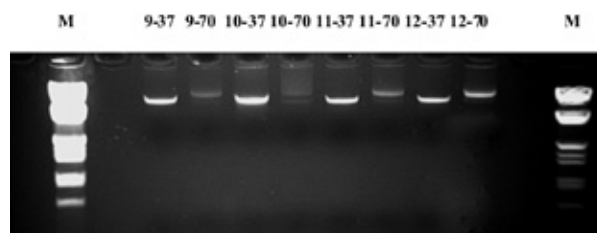


Рис. 2. Сравнительные результаты гель-электрофореза препаратов ДНК, выделенных из лейкоцитов крови

Препараты ДНК выделены из лейкоцитов крови после 30-минутной инкубации в лизирующем буфере DNA IQ™ при температурах +37 °С и +70 °С. Цифры от 9-37-12-37 и 9-70-12-70 обозначают номера биологических образцов и температуру их инкубации.

Молекулярный размер полос размерного стандарта (ДНК фага λ, обработанная рестриктазами *EcoRI* и *HindIII*): 21226 н. п. (нуклеотидных пар), 5148 н. п., 4268 н. п., 3530 н. п., 2027 н. п. и 1904 н. п. (визуализируются как одна полоса в геле), 1584 н. п. и 1375 н. п. (визуализируются как одна полоса в геле), 947 н. п., 831 н. п.

Рисунок 2 отражает уменьшение подвижности митохондриальной ДНК в связи с переходом ее суперспиральных кольцевых молекул в релаксированную форму под действием нагревания до 70 °С (за счет разрушения внутримолекулярных слабых взаимодействий, либо за счет односторонних разрывов ковалентно замкнутых молекул мтДНК [7]). Релаксированная и суперспиральная формы мтДНК имеют одинаковую молекулярную массу, но разный объем, вследствие этого за счет более компактной формы [8] суперспиральные молекулы мтДНК (инкубация при 37 °С) в агарозном геле будут обладать большей подвижностью (за счет меньшего сопротивления волокон агарозы) по сравнению с релаксированными мтДНК (инкубация при 70 °С).

В то же время спектрофотометрический анализ оптической плотности ($\lambda = 260$ нм) растворов нуклеиновых кислот (всего было исследовано 20 препаратов ДНК), экстрагированных из клеток буккального эпителия, показал следующие результаты (табл. 1).

Исходя только из результатов спектрофотометрической количественной оценки, может показаться, что при +70-градусной инкубации в лизирующем буфере ДНК экстрагируется примерно на 40% больше. Однако такие результаты не являются следствием лучшей экстракции ДНК (о чем можно судить по результатам гель-

Таблица 1. Спектрофотометрические показатели препаратов ДНК клеток Buccalного эпителия, растворенной в TE-буфере (по результатам 10 независимых измерений)

Температура 30-минутной инкубации в лизис-буфере	Оптическая плотность при 260 нм (A_{260})	A_{260}/A_{280}	Концентрация (нг/мкл) ($C = A_{260} / 0,020$)	Парный критерий Стьюдента
37 °C	0,283 ± 0,0425	1,80 ± 0,152	14,16 ± 2,159	t = 5,044, p = 0,007
70 °C	0,395 ± 0,0725	1,75 ± 0,080	19,78 ± 3,588	

Таблица 2. Спектрофотометрические показатели водных растворов ДНК K562 (40 нг/мкл) после 30-минутной температурной инкубации (по результатам 5 независимых измерений)

Температура	Оптическая плотность при 260 нм (A_{260})	A_{260}/A_{280}	Концентрация ($C = A_{260}/0,020$), измеренная через 15 минут после окончания эксперимента	Статистика Стьюдента (концентрации ДНК по отношению к значениям, полученным после 25-градусной инкубации)
25 °C	0,810 ± 0,004	1,89 ± 0,020	40,5 ± 0,20	—
37 °C	0,811 ± 0,018	1,91 ± 0,038	40,6 ± 0,91	t = 0,241, p = 0,810
56 °C	1,015 ± 0,018	1,90 ± 0,051	50,7 ± 0,89	t = 27,52, p = 2,21 × 10 ⁻⁶
65 °C	1,015 ± 0,011	1,94 ± 0,046	52,5 ± 0,51	t = 48,91, p = 2,29 × 10 ⁻⁶
70 °C	1,045 ± 0,010	1,94 ± 0,030	52,3 ± 0,47	t = 51,77, p = 2,17 × 10 ⁻⁶

Примечание: концентрация ДНК K562 была нормализована непосредственно перед началом эксперимента.

Таблица 3. Количественные характеристики водных растворов ДНК K562 (0,5 нг/мкл) после 30-минутной температурной инкубации (по результатам 5 независимых измерений)

Температура инкубации	β-актин		X-хромосома	
	Концентрация ДНК, измеренная после инкубации, нг/мкл	Парный критерий Стьюдента	Концентрация ДНК, измеренная после инкубации, нг/мкл	Парный критерий Стьюдента
37 °C	0,263 ± 0,030	t = 16,03 p = 0,00049	0,304 ± 0,038	t = 15,98 p = 0,0005
70 °C	0,0844 ± 0,033		0,065 ± 0,019	

электрофореза), а с оптическими свойствами оснований в составе полинуклеотидных цепочек. Пуриновые и пиримидиновые основания обладают максимумом поглощения при 260 нм. Вхождение нуклеотидов в состав

нуклеиновых кислот не изменяет положение максимума, но значительно снижает интенсивность поглощения (примерно на 40%) — так называемый гипохромный эффект [9]. При нарушении упорядоченной двухспираль-

ной конформации ДНК вследствие денатурации и гидролиза будет наблюдаться, наоборот, увеличение оптической плотности при 260 нм (т. н. гиперхромный эффект).

Ниже приведены спектрофотометрические показатели водных растворов коммерческого препарата ДНК человека — K562 (Promega), с концентрацией 40 нг/мкл после 30-минутной инкубации при различных температурах (табл. 2).

Экспериментальному исследованию подвергались 25 препаратов ДНК (каждому режиму инкубации соответствовали 5 препаратов ДНК). Из таблицы 2 видно, что инкубация ДНК при температурах выше 56 °С приводит к увеличению оптической плотности почти на 30%. Таким образом, оценка количества ДНК в экстрактах только с помощью спектрофотометрического метода может ввести исследователя в заблуждение.

Далее мы исследовали эффект влияния температуры инкубации на количественный выход активной ДНК-матрицы из образцов с концентрацией ДНК 0,5 нг/мкл, как аналогов сложных образцов в судебно-медицинской и криминалистической практике, содержащих крайне малые количества ДНК (например, из отпечатков пальцев). Экспериментальному исследованию подвергались 10 препаратов ДНК (по 5 параллелей для каждого режима инкубации). Мы оценили количество ДНК с помощью ПЦР «в реальном времени» после инкубации при температурах +37 °С и +70 °С. Из таблицы 3 видно достоверное уменьшение концентрации активной ДНК-матрицы более чем в 3 раза после инкубации ДНК при температуре +70 °С по сравнению с +37 °С (табл. 3).

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что +37 °С является наиболее оптимальной температурой инкубации биологического материала в лизирующем буфере DNA iQ, т.к. при данной температуре по сравнению с +56 °С и +70 °С скорость гидролиза фосфодиэфирных связей ДНК минимальна, что особенно важно при работе с объектами, содержащими крайне малые количества ДНК, такими как отпечатки пальцев, следы сухой крови и др.

Литература

1. Essentials of Nucleic Acid Analysis. A Robust Approach / Ed. Keer J. T., Birch L. Published by The Royal Society of Chemistry. Cambridge, 2008: 248 p.
2. Лебедев К. А. Иммунология в клинической практике. М.: МЭБ, 1996: 387 с.
3. DNA IQ™ System — Small Sample Casework Protocol. Technical Bulletin. Madison. Promega Corporation, 2006: 14 p.
4. Лапенков М. И., Плахина Н. В., Алексеев Я. И. и соавт. Разработка тест-системы для количественной и качественной оценки содержания ДНК в криминалистических образцах методом полимеразной цепной реакции в реальном времени // Судебно-медицинская экспертиза. 2011; 2: 34–38.
5. Кулайчев А. П. Методы и средства анализа данных в среде Windows. Stadia 6.0. М.: Информатика и компьютеры, 1996: 257 с.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990: 350 с.
7. Водолазкин Д. И., Чистяков В. А., Гуськов Е. П. и соавт. Дегградация нуклеиновых кислот в условиях генерации супероксид-аниона в присутствии ионов меди // Молекулярная биология. 1987; 21 (6): 1664–1670.
8. Страйер Л. Биохимия. М.: Мир, 1985; 3: 21.
9. Ашмарин И. П. Молекулярная биология. Л.: Ленинградский университет, 1977: 367 с.

ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПЕЧЕНИ И ЛАТЕНТНОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ

Л.А. ТЕТЕРИНА, В.Г. РАДЧЕНКО, А.Н. СУВОРОВ, П.В. СЕЛИВЕРСТОВ, Е.А. ЧИХАЧЕВА
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

***Резюме.** Интерес к изучению осложнений заболеваний печени, в частности латентной печеночной энцефалопатии, обусловлен широким ее распространением, трудностью диагностики, отсутствием дифференцированных подходов к лечению. Выявленная корреляционная зависимость влияния степени дисбиоза на развитие латентной печеночной энцефалопатии способствует формированию полиорганной патологии, в том числе связанной с нарушением кишечного микробиоценоза при хронических заболеваниях печени, является отдельным звеном патогенеза печеночной энцефалопатии. Дисбиоз толстой кишки у больных хроническими заболеваниями печени является триггерным фактором развития латентной печеночной энцефалопатии, а его степень напрямую коррелирует со временем выполнения тестов связи чисел и линий, проявлением астеновегетативного синдрома, кишечной диспепсии, цитолиза, холестаза, печеночно-клеточной недостаточности.*

***Ключевые слова:** хронические заболевания печени, латентная печеночная энцефалопатия, дисбиоз толстой кишки.*

LARGE INTESTINAL MICROBIOCENOSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC LIVER DISEASES AND LATENT HEPATIC ENCEPHALOPATHY

L.A. TETERINA, V.G. RADCHENKO, A.N. SUVOROV, P.V. SILIVERSTOV, E.A. CHIHACHEVA
State budget educational institution of higher professional education «North-West I. I. Mechnikov state medical University» Ministry of Health of Russian Federation

***Summary.** The problem of liver diseases complications including latent hepatic encephalopathy attracts the attention of investigators because of their high prevalence, diagnostic difficulties and absence of differentiated approach to treatment. Correlation links were found between the degree of disbiosis and severity of latent hepatic encephalopathy. These links may be one of the causes of the multiorgan affection in patients with chronic liver diseases. Thus, intestinal microbiocenosis disturbances can be discussed as a separate pathogenetic pathway of hepatic encephalopathy formation. Large intestine disbiosis in patients with chronic liver diseases is the trigger of latent hepatic encephalopathy development and its degree correlates with the tests of numbers and lines performing time, astenic syndrome manifestations, intestinal dyspepsia, cytolysis, cholestasis and hepatocellular insufficiency.*

***Key words:** chronic liver diseases, latent hepatic encephalopathy, large intestinal disbiosis.*

Данные для корреспонденции

Тетерина Людмила Анатольевна — врач-терапевт, терапевтическое отделение № 1,
ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
e-mail: lorein06@mail.ru, тел. +7 (905) 256-26-05

Селиверстов Павел Васильевич — кандидат медицинских наук,
доцент кафедры внутренних болезней и нефрологии
ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России,
e-mail: seliverstov-pv@yandex.ru, тел. +7 (911) 149-40-91

Ежегодно во всех индустриально развитых странах отмечается рост числа хронических заболеваний печени (ХЗП) более чем у 5% взрослого населения [1; 2; 3; 4]. В связи с этим восстановление физического, психического и социального статуса больных ХЗП и улучшение их качества жизни приобретает общегосударственное значение.

Среди неврологических расстройств при заболеваниях печени энцефалопатии, диагностируемые у 30% – 80% больных, являются наиболее тяжелыми и прогностически неблагоприятными осложнениями, сохраняясь на всем протяжении заболевания, и обуславливают определенные трудности в их лечении [1; 5].

Термин «печеночная энцефалопатия» (ПЭ) представляет собой комплекс потенциально обратимых невропсихических нарушений, возникающих как следствие острой или хронической печеночной недостаточности и/или портосистемного шунтирования крови. ПЭ чаще возникает на фоне форсированного диуреза, желудочно-кишечных кровотечений, парацентеза, хирургических вмешательств, алкогольных эксцессов, нарушения микробиоценоза кишечника, воспалительных заболеваний кишечника, инфекционных заболеваний, вследствие повышенного потребления белков, портосистемном шунтировании. Невро-психические нарушения при ПЭ в большинстве случаев потенциально обратимы, так как являются отражением метаболического нарушения равновесия между торможением и возбуждением активности нейронов.

Согласно современной классификации портосистемной (печеночной) энцефалопатии, Herber и Schomerus (2000) [6] выделяется две стадии: латентная (субклиническая) и клинически выраженная. Распознавание и лечение латентной печеночной энцефалопатии (ЛПЭ) при ХГ крайне важно по трем причинам: во-первых – частота ЛПЭ у больных хроническими гепатитами составляет более 55% и не зависит от их этиологии, и увеличивается до 77% у больных с циррозом печени [7; 8]. Во-вторых, ЛПЭ способна влиять на качество повседневной жизни, приводя к снижению работоспособности. В-третьих – ЛПЭ сопровождается неадекватной реакцией пациента в экстремальных условиях, в том числе при вождении автомобиля, что сопряжено с повышенным риском создания аварийных ситуаций.

Стадию клинически выраженной ПЭ, в свою очередь, делят на 4 степени развития:

1 – легкую (нарушение сна, невозможность сосредоточиться, легкое изменение личности, рассеянность, апраксия), 2 – среднетяжелую (летаргия, усталость, сонливость, апатия, неадекватное поведение с заметными изменениями в структуре личности, нарушениями ориентации во времени, «хлопающий» тремор, монотонная речь), 3 – тяжелую (дезориентация, ступор, выраженная дезориентация во времени и пространстве, бессвязная речь, агрессия, «хлопающий» тремор, судороги), 4 – кома (отсутствие сознания).

Современная модель патогенеза печеночной энцефалопатии является многофакторным, полиорганным процессом, который протекает параллельно на уровнях печени и головного мозга и представляется как результат комплексного воздействия и взаимного усиления нескольких факторов: эндогенных нейротоксинов, среди которых ведущее значение имеет аммиак, аминокислотного дисбаланса и изменения функциональной активности нейротрансмиттеров и их рецепторов. Важным звеном патогенеза ПЭ при хронических заболеваниях печени является формирование полиорганной патологии, в том числе и связанной с кишечным дисбиозом [7; 8]. Однако до настоящего времени до конца не выявлено, какие звенья патогенеза наиболее способствуют формированию различных стадий ПЭ. В настоящее время доказано, что в ее развитии участвуют [7; 8; 9]:

1. Эндогенные нейротоксины: аммиак; меркаптаны, производные метианина; коротко- и среднецепочечные жирные кислоты; фенолы.

2. Аминокислотный дисбаланс: повышение ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, метионин, триптофан); уменьшение уровня аминокислот с разветвленной цепью: лейцин, изолейцин, валин.

3. Нарушение баланса нейротрансмиттеров: увеличение концентрации ложных нейротрансмиттеров: октопамин, фенилэтаномин и др.; уменьшение уровня возбуждающих нейротрансмиттеров: дофамин, норадреналин; увеличение содержания тормозных нейротрансмиттеров: серотонин, ГАМК.

4. Изменение постсинаптических рецепторов: повышение активности бензодиазепиновых рецепторов (пикротоксин).

5. Нарушение функционирования гематоэнцефалического барьера: повышение проницаемости; нарушение транспорта энергетических субстратов.

На основании этого в настоящее время существует три теории развития печеночной энцефалопатии [10; 11; 12]: токсическая [13; 14], ложных нейротрансмиттеров [15] и нарушения обмена γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) [16].

Изменения микробиоты кишечника при хронических заболеваниях печени

Важную роль в развитии ПЭ играет изменение микробиоценоза желудочно-кишечного тракта, поскольку совместно с печенью микробиоценоз участвует во взаимодействующих процессах детоксикации.

В настоящее время нормальная микробиота человека является неотъемлемой структурной и функциональной компонентой организма. Микрофлора нормальной толстой кишки человека объединена в единую экологическую систему – «организм человека – нормальная микрофлора», в которой выделяют две взаимосвязанные субпопуляции: полостная и пристеночная (мукозная) микрофлора, имеющие тесные структурные и функциональные связи между собой и с кишечной стенкой [17;

18; 19]. Изменения соотношения нормальной микрофлоры пищеварительного тракта могут быть как кратковременными — дисбактериальные реакции, так и стойкими — дисбиоз или дисбактериоз, — представляя собой состояние экосистемы, при котором нарушается функционирование всех ее составных частей — организма человека, его микрофлоры и окружающей среды, а также механизмов их взаимодействия, что предрасполагает к возникновению заболеваний [18; 20].

Дисбактериоз (дисбиоз) кишечника согласно ГОСТу 91500.11.0004-2003 определяется как клинико-лабораторный синдром, возникающий при ряде заболеваний и клинических ситуаций, характеризующийся симптомами поражения кишечника, изменением качественного и/или количественного состава нормальной микрофлоры, а также транслокацией ее различных видов в несвойственные биотопы и их избыточным ростом [21]. При этом кишечный дисбактериоз (дисбиоз) рассматривается исследователями как клинико-микробиологический синдром, осложняющий течение основного заболевания за счет неблагоприятного воздействия токсинов, продуцируемых условно-патогенными микроорганизмами [22, 23]. Кишечный дисбиоз проявляется микробиологическими изменениями соотношений между аэробной и анаэробной микробиотой, снижением содержания бифидобактерий, лактобактерий и бактероидов, увеличением численности условно-патогенных бактерий, количества *E. coli* с измененными биологическими свойствами (со сниженной ферментативной активностью, лактозонегативных, неподвижных, безиндолных и др.), появлением отсутствующих в норме гемолизирующих форм *E. coli* и стафилококков, экспансией микрофлоры за границы привычной зоны обитания.

В настоящее время единой классификации в определении степени дисбактериоза не существует. Многие авторы придерживаются классификации по степени выраженности, основанной на данных клинического и микробиологического исследования, которая также указана в отраслевом стандарте (приказ МЗ РФ № 231 от 2003 г.) «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» [21; 24; 25].

При заболеваниях органов пищеварения (хронические воспалительные заболевания кишечника, хронический гастрит, СРК, язвенная болезнь и др.) установлено, что при ХЗП нарушения кишечной микробиоты встречаются более чем у 90% больных, причем тяжесть клинических проявлений заболевания нередко связывают с выраженностью изменений микроэкологии кишечника. Отмечено, что сниженная детоксикационная функция микробиоты при дисбиозе кишечника увеличивает нагрузку на ферментативные системы печени, что способствует возникновению в ней метаболических и структурных изменений. В то же время, нарушения процессов синтеза и экскреции компонентов желчи при заболеваниях печени могут привести к нарушению микробиоты

кишечника и в конечном итоге к развитию дисбиоза [24; 27]. Увеличение содержания потенциально патогенных бактерий приводит также к повышению образования эндотоксинов, которые, проникая через слизистую оболочку кишечника в местную систему кровообращения, а затем через воротную вену в печень, вызывают повреждения гепатоцитов или потенцируют неблагоприятные действия других токсических веществ. Около 90% всех эндотоксинов высвобождается факультативно анаэробными бактериями. Доказано, что гнилостные и патогенные бактерии производят в кишечнике токсические продукты, в частности, *E. coli* и клостридии — аммиак, амины, нитрозоамины, фенолы, крезолы, индолы, вторичные желчные кислоты, агликины; бактероиды и стрептококки — нитрозоамины, вторичные желчные кислоты; протей — аммиак, амины, индол. Конкретными повреждающими механизмами в этом случае являются разрушение клеточных мембран, нарушение ионного транспорта, фрагментация нуклеиновых кислот, образование продуктов свободнорадикального окисления, индукция апоптоза. По результатам наших исследований, наблюдается прямая взаимосвязь между характером изменения микрофлоры кишечника и формированием ПЭ за счет повышенного образования эндотоксинов и аммиака, возникающего при дисбиозе кишечника, способного стать триггерным фактором развития печеночной энцефалопатии при ХЗП [24; 26].

Функциональное и структурное повреждение кишечной стенки отражается в увеличении ее проницаемости для макромолекул и бактерий, приводя к феномену бактериальной транслокации. Частота высевания патогенной кишечной флоры при циррозе класса С в 5 раз превышает таковую при циррозе А. Маркером бактериальной транслокации, прогнозирующим частоту развития тяжелых бактериальных инфекций, является повышение уровня сывороточного липополисахаридсвязывающего белка. У больных циррозом печени отмечается усиленный рост условно-патогенной флоры — *Klebsiella*, *Enterobacter*, *S. aureus* и грибов рода *Candida* на 2–3 порядка по сравнению с больными ХВГ. Первоначальным звеном бактериальной транслокации у больных ХЗП служит синдром избыточного бактериального роста. Очевидна роль избыточной бактериальной пролиферации в кишечнике в развитии ПЭ, что обусловлено интенсивным образованием кишечной микрофлорой помимо аммиака других нейротоксических метаболитов, таких как меркаптан, короткоцепочных жирных кислот, фенолов и др. Показательно, что нередко основным и единственным симптомом спонтанного бактериального перитонита является нарастание ПЭ [15; 28].

В многочисленных клинических исследованиях показано, что метаболические нарушения в печени, нередко ассоциированные с дисбактериозом кишечника, включают в себя как печеночные, так и кишечные звенья патогенеза. В формировании стеатоза и стеатогепатита

выделяют экзогенные факторы риска — избыточное поступление в печень из кишечника продуктов гидролиза липидов (жирных кислот), глюкозы, фруктозы, галактозы, алкоголя, и эндогенные — повышение концентрации и нарушение окисления жирных кислот в гепатоците, образующихся при липолизе периферического жира, который усиливается при дефиците или снижении тканевой чувствительности к инсулину, накопление в гепатоцитах триглицеридов, относительный или абсолютный дефицит апопротеинов В, С1–С3, Е. Трансформация стеатоза в стеатогепатит обусловлена: повышением продукции TNF-а жировой тканью, увеличением концентрации свободных жирных кислот, которые оказывают прямой повреждающий эффект на мембраны гепатоцитов и активируют цитохром P450–2E 1 с повышением перекисного окисления липидов, накоплением реактивных форм кислорода (оксидативный стресс) и образованием избыточного количества высокотоксичных ксенобиотиков. Существенное значение в трансформации стеатоза в стеатогепатит играет наличие избыточного бактериального роста в кишечнике. Так, по результатам водородного дыхательного теста у 50–75% таких больных выявляют избыточную бактериальную пролиферацию в тонкой кишке [15; 24].

Наиболее частыми клиническими признаками дисбиоза у больных ХЗП являются расстройства стула, (неустойчивый стул, диарея, запоры), метеоризм, абдоминальный болевой синдром (монотонная, тянущая, распирающая боль), синдром желудочно-кишечной диспепсии, симптомы мальдигестии. Для данной категории больных характерны проявления астеновегетативного, геморрагического, холестатического синдромов. Прогрессирование дисбиоза сопровождается нарастанием в крови уровня общего билирубина, его фракций, активности АСТ, АЛТ, ЩФ и ГГТП, увеличением СОЭ, снижением альбуминов, ПТИ, усугубляются изменения в показателях липидограммы. Отмечается выраженность синдрома иммунного воспаления за счет увеличения содержания γ -глобулинов и иммуноглобулинов, свидетельствующего об активации гуморального звена иммунитета [3; 29].

Наиболее распространенным методом лабораторной диагностики заболевания в настоящее время является посев кала на дисбактериоз. Данный метод имеет ряд общепринятых издержек: длительность получения результатов, использование дорогостоящих питательных сред, зависимость от соблюдения сроков транспортировки и качества сред, преимущественное определение внутрипросветной флоры и наряду с ней транзитной (пассажной), неоднородность выделения микроорганизмов из разных отделов испражнений, низкая воспроизводимость результатов и др., невозможность воссоздания нативных условий обитания микроорганизмов. Все вышесказанные недостатки не дают полного представления о населяющей гликокаликс автохтонной (резидентной) микрофлоре. Довольно часто забывают

о низкой чувствительности данного метода и возможности получения ложно-отрицательных результатов. Кроме того, основным и, по-существу, главным недостатком является отсутствие возможности приблизить врача к выявлению органической или функциональной патологии ЖКТ, приведшей к изменению микробиоценоза, и проводить не симптоматическое, а этиопатогенетическое лечение [30; 31].

Молекулярно-генетические методы: позволяющие идентифицировать микроорганизмы посредством определения уникальной последовательности оснований дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК) исследуемых микробов; в последние годы широкое распространение получил способ определения видов микроорганизмов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностика). В основе ПЦР-диагностики лежит комплементарное достраивание участка геномной ДНК или РНК возбудителя, осуществляемое *in vitro* с помощью фермента термостабильной ДНК-полимеразы. С помощью ПЦР-диагностики определяются некоторые представители микрофлоры с внутриклеточной или мембранной локализацией. Метод отличается быстротой выполнения. Однако информативность исследования высока только в отношении ограниченного круга условно-патогенных и патогенных микроорганизмов и вирусов. Данный метод применяется в основном для верификации инфекционной патологии [30; 31].

Газо-жидкостная хроматография фекалий (ГЖХ): метод позволяет оценить вещества, связанные с жизнедеятельностью микроорганизмов (именно тех, которые не определяются при рутинном бактериологическом исследовании, требующем специальных условий культивирования анаэробов), методом ГЖХ-анализа. Метод позволяет быстро и точно оценить состояние индигенной микрофлоры. Кроме того, отличительной особенностью разработанного метода является то, что в результате накоплен материал не только по верификации родового состава микроорганизмов, но и составлена клиническая база данных содержания КЖК (учитывая их физиологические эффекты) во многих биологических субстратах при различной патологии ЖКТ [32].

В настоящее время для **диагностики печеночной энцефалопатии** применяют:

Оценку клинических симптомов (оценка степени расстройства сознания, интеллекта, характера изменений личности, речи). При ЛПЭ сознание не изменено, при целенаправленном обследовании отмечается снижение концентрации внимания и памяти.

Оценку психоневрологических изменений, выявляемых при психометрическом тестировании. С этой целью могут применяться: 1. Тесты на быстроту познавательной деятельности (тест связи чисел (часть А и В), тест Reitan; тест «число-символ»), 2. Тесты на точность тонкой моторики (тест линии (лабиринт); тесты обведения пунктирных фигур). Чувствительность данных

методов в диагностике ПЭ достигает 80%. Однако использование психометрического тестирования с целью активизации психоневрологических изменений при ПЭ обладает рядом ограничений: отсутствие унифицированности, возможность эффекта тренинга при оценке динамики течения ПЭ [16].

Инструментальные методы диагностики ПЭ:

А) **Электроэнцефалография (ЭЭГ)**. При ПЭ в зависимости от стадии энцефалопатии наблюдается замедление активности α -ритма: при ПЭ — 0 и латентной стадии — частота α -ритма 8,5–12 колебаний в 1 сек, при ПЭ I степени клинически выраженной стадии — частота α -ритма 7–8 колебаний в 1 сек, при ПЭ II степени клинически выраженной стадии — частота α -ритма 5–7 колебаний в 1 сек, при ПЭ III степени клинически выраженной стадии — частота α -ритма 3–5 колебаний в 1 сек, при ПЭ IV степени клинически выраженной стадии — частота α -ритма < 3 колебаний в 1 сек, с «выявлением медленных низкоамплитудных колебаний». Начиная со II стадии появляется δ - и θ -активность. Относительно типично, но неспецифично появление, начиная со II стадии, билатерально-синхронных всплесков острых «трехфазных волн», в основном во фронтотемпоральных отведениях. Электроэнцефалография (ЭЭГ) отражает общую биоэлектрическую активность головного мозга (БЭА) и не позволяет объективно оценить когнитивные нарушения, не дает информации об особенностях этих расстройств. По мнению ряда авторов, чувствительность ЭЭГ при ПЭ составляет не более 30–40%, и часто изменения ЭЭГ не коррелируют с тяжестью течения заболевания, они имеют лишь вспомогательное значение [6]. Тем не менее, у больных, страдающих ХЗП и находящихся в ясном сознании, наличие на ЭЭГ таких изменений — достоверный диагностический признак [16].

Б) **Зрительные вызванные потенциалы Р-300** (или тест «частоты мерцания», являющийся модификацией ЭЭГ). При проведении теста «частоты мерцания» используется высокочастотный свет, который воспринимается обследуемым с помощью специальных оптических очков. Значения критической частоты мерцания (critical flicker frequency CFF) у здоровых лиц превышают частоту в 39 Гц, у больных же этот показатель существенно ниже. Результаты данного теста статистически достоверно коррелируют с показателями психометрических тестов [16].

В) **Магнитно-резонансная спектроскопия** — основные изменения касаются повышения интенсивности сигнала T1 базальных ганглиев и белого вещества мозга, уменьшения величины соотношения миоинозитол/креатин (в результате уменьшения содержания миоинозитола в астроцитах) и повышения пика глутамина в сером и белом веществе мозга (вследствие накопления глутамина в астроцитах). Выраженность сигнала глутамина может использоваться также для характеристики клинической стадии ПЭ. Чувствительность данного метода при ЛПЭ приближается к 90–100%. Однако, по данным дру-

гих авторов, вышеперечисленные изменения, выявляемые при магнитно-резонансной спектроскопии, связаны не с ПЭ, а коррелируют с концентрацией билирубина и марганца в крови [33; 34].

Г) **Магнитно-резонансная томография (МРТ)** позволяет количественно оценить выраженность отека головного мозга и атрофии коры при клинически выраженных стадиях ПЭ. Эти изменения обусловлены серьезными нарушениями функции печени и особенно выражены у пациентов с длительно персистирующей ПЭ. При ЛПЭ часто изменений не обнаруживается [5].

Однако высокая стоимость применения методик: зрительно вызванных потенциалов Р-300, магнитно-резонансной спектроскопии и МРТ головного мозга — позволяет их использовать лишь в единичных научных центрах [5], что требует дальнейшего поиска объективных, инструментальных, простых методик для диагностики ЛПЭ.

Лечение печеночной энцефалопатии

Патогенетическая терапия ПЭ включает три основные группы мероприятий [11; 14]: 1. Поиск причин, вызвавших развитие ПЭ, лечение основного заболевания и устранение разрешающих факторов энцефалопатии, в том числе связанных с дисбиозом толстой кишки. 2. Диета с ограничением поступления с пищей животного белка, заменой его на растительный, обеспечение достаточной калорийности питания для предотвращения отрицательного баланса азота, снижения степени гипераммонии. 3. Медикаментозная терапия с использованием нескольких классов лекарственных веществ:

- I) Препараты, снижающие концентрацию аммиака крови (связывающие аммиак крови, стимулирующие обезвреживание аммиака в орнитинном цикле, снижающие поступление аммиака из толстой кишки — невсасывающиеся антибиотики, про- и пребиотики).
- II) Препараты, уменьшающие тормозные процессы в ЦНС (антагонист бензодиазепиновых рецепторов, аминокислоты с разветвленной боковой цепью).
- III) Препараты с различным механизмом действия (антиоксиданты, цинк, препарат α -липовоевой кислоты).

Все же, несмотря на имеющийся опыт применения различных препаратов для лечения печеночной энцефалопатии, в настоящее время в литературе имеется мало данных, посвященных изучению влияния средств, нормализующих микробиоту толстой кишки на разрешение ПЭ, что делает эти исследования актуальными.

Цель исследования

Оценка количественного и качественного состава микробиоты толстой кишки и ее роли в развитии латентной печеночной энцефалопатии для оптимизации тактики терапии больных хроническими заболеваниями печени.

Материалы и методы исследования

Обследовано 269 больных ХЗП, средний возраст $40,2 \pm 8,61$ года. Соотношение мужчин: женщин — 128:141 (47,6% : 52,4%). Диагноз ХГ подтверждался жалобами, анамнезом заболевания и жизни, данными объективного осмотра, результатами лабораторно-инструментальных, морфологических методов исследования. По этиологическому фактору количество пациентов ХГ разных нозологических форм было сопоставимо: хронический алкогольный гепатит (ХАлГ) — 35 (25%) человек, хронический вирусный гепатит В или С (ХВГ) — 35 (25%), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) — 40 (29%) и аутоиммунный гепатит (АИГ) — 30 (21%) обследуемых. Диагноз ХЗП соответствовал классификации экспертов ВОЗ (Лос-Анджелес, 1996), МКБ-10, Knodell, Desmet и соавт. и подтверждался жалобами, анамнезом заболевания и жизни, данными объективного осмотра и результатами лабораторно-инструментальных методов исследования.

При характеристике ПЭ у пациентов с ХЗП применялась классификация портосистемной (печеночной) энцефалопатии по Herber и Schomerus 2000 г. Стадия ПЭ у больных ХЗП определялась на основании: а) анализа жалоб пациентов по дневникам самонаблюдения, б) психометрического тестирования (тест связи чисел, тест линии), в) оценки когнитивных функций, г) диагностики депрессивных состояний по методике Зунге, д) частотного анализа электроэнцефалограммы, е) результатов консультации невролога, психиатра. По показаниям проводилась УЗДГ сосудов головы и шеи.

Критерии исключения из исследования: тяжелая сопутствующая патология, способная повлиять на прогноз и характер проявления печеночной энцефалопатии, онкологические заболевания в анамнезе, тяжелая сердечно-сосудистая и дыхательная патологии, острое нарушение мозгового кровообращения (в анамнезе), острые инфекционные процессы и обострение сопутствующих хронических заболеваний, сахарный диабет 1 и 2 типа, корригируемый инсулином, лечение антибиотиками, неverified заболелание печени.

Степень выраженности дисбиоза кишечника оценивалась согласно отраслевому стандарту «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004–2003), Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 231 от 9 июня 2003 года.

В зависимости от степени выраженности печеночной энцефалопатии 269 человек распределены были на 3 группы: 1) основная группа — 134 (50%) пациента ХЗП с латентной ПЭ (ЛПЭ), 2) группа сравнения 1 — 74 (27%) человек ХЗП без признаков ПЭ (ПЭ-0), 3) группа сравнения 2 — 61 (23%) больной ХЗП с ПЭ 1 степени клинически выраженной стадии (ПЭ-1). По нозологической форме пациенты поделены на 4 подгруппы: хронический алкогольный гепатит (ХАлГ) — 72 (27,0%), хронический вирусный гепатит В или С (ХВГ) — 80 (30,0%), неалко-

гольный стеатогепатит (НАСГ) — 83 (31,0%), аутоиммунный гепатит (АИГ) — 34 (12,0%) человека.

Контролем служили 30 практически здоровых добровольцев, 15 мужчин и 15 женщин молодого возраста ($27,8 \pm 1,82$ года).

Изучение нормальной микробиоты толстой кишки здоровых людей и характера ее изменений при ХЗП проводилось в соответствии с методическими рекомендациями (Марков Н. И. и соавт., 1977; Минушкин О. Н. и соавт., 1991 и др.).

В комплекс биохимического исследования сыворотки крови входило определение общего белка, альбумина, билирубина, АЛТ, АСТ, ГГТП, ЩФ, глюкозы, протромбиновой активности плазмы, фибриногена, мочевины, липидограммы и др. Исследовались иммунологические показатели: ИЛ-1b, ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-10, γ -глобулин.

Психологическое обследование включало индивидуальную беседу с пациентом и применение психодиагностических шкал и тестов (тест связи чисел и тест линии). Также проводилась ЭЭГ для подтверждения нарушений функции мозга, с оценкой частотного диапазона, амплитуды и особенностей зонального распределения колебаний различных диапазонов.

Оценка течения ЛПЭ с применением препаратов, нормализующих микробиоту толстой кишки в составе комплексной терапии, состояла в том, что путем свободной выборки из 111 пациентов ХЗП с ЛПЭ было сформировано 5 групп с соблюдением принципа релевантности переменных и обеспечения сопоставимости наблюдения случаев по полу, возрасту, этиологической структуре, степеням выраженности дисбиоза, тяжести и степени активности патологического процесса и др.

1 группа — 26 человек. Лечение: метаболическая терапия, Гепамин (смесь аминокислот: валин, аргинин, изолейцин, лейцин и натуральное растворимое пищевое волокно фибрегам) — по 0,25–0,3 г/кг веса больного и Эссенциале Форте Н по 2 капс. 3 раза в день, курсом приема 4 недели. 2 группа — 25 человек. Лечение: метаболическая терапия, Эссенциале Форте Н (2 капс. 3 раза в день) и Мукофальк (препарат из оболочки семян подорожника овального (*Plantago ovata*) — 1 пакетик 3 раза в день, курс — 4 недели. 3 группа — 20 человек. Лечение: метаболическая терапия, Ламинолакт (*Enterococcus faecium*, L-3 и пищевые волокна, пектин, клетчатка) — по 2 др. 3 раза в день, Эссенциале Форте Н — по 2 капс. 3 раза в день в течение 4 недель. 4 группа — (сравнения 1) — 20 человек. Лечение — Эссенциале Форте Н по 2 капс. 3 раза в день и Дюфалак (лактолоза) в дозе 30 мл 1 раз/сутки утром во время еды в течение 4 недель. 5 группа — (сравнения 2) — 20 человек. Лечение — прием Эссенциале Форте Н по 2 капс. 3 раза в день в течение 4 недель.

Метаболическая коррекция включала 2-нед. курс терапии: раствор глюкозы 5% — 500,0 мл, панангин 10,0 мл — ежедневно внутривенно капельно, раствор пиридоксина гидрохлорид (витамин B₆) 5% — 2,0 мл

и тиамин бромид (витамин В₁) 3% — 2,0 мл — ежедневно внутримышечно, раствор аскорбиновой кислоты (витамин С) 5% — 5,0 мл — ежедневно внутривенно струйно.

После 1 месяца лечения 45 больных (по 15 человек с ХЗП и ЛПЭ из групп 1, 2 и 3) находились под динамичным наблюдением в течение 6 месяцев после окончания проводимой терапии. Программа терапии включала метаболическую коррекцию и эссенциальные фосфолипиды. Оценка лечебной эффективности проводилась через 2, 4 недели, 3 и 6 месяцев.

По результату обследования все клинические, бактериологические, лабораторно-инструментальные и психометрические показатели были адаптированы для математической обработки и изучались с использованием корреляционного, регрессионного и дискриминантного анализа, с помощью программы «SPSS 13.0». Для статистической обработки полученных данных использовали *T*-критерий Стьюдента, χ^2 -критерий Пирсона, непараметрический критерий *U*-тест по методу Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Клиническими проявлениями у пациентов ХЗП с ЛПЭ являлись астеновегетативный синдром (80%), кишечная и желудочная диспепсия (62% и 60%), отличающиеся от аналогичных показателей группы ПЭ-0 (71%, 32%, 22% соответственно). Психомоторные нарушения у пациентов ЛПЭ характеризовались изменениями когнитивных функций (65%). Изменение ритма сна у пациентов с ЛПЭ выявлено не было, однако потребность в дневном 1–2-часовом сне выявлена у 72 человек (54%). Выполняя психометрическое тестирование, пациенты с ЛПЭ легко понимали поставленную перед ними задачу, однако время, затраченное на тестирование, превышало 30 сек. При оценке ТСЧ, ТЛ достоверных различий между нозологическими формами заболеваний печени выявлено не было, отмечено, что пациенты с ХАЛГ больше испытывали трудности при выполнении теста линий, характеризующего точность моторики ($КО_{ТЛ\text{ общ}} - 10,9 \pm 1,20$ ($p < 0,05$)), тогда как при других нозологических формах АИГ — $КО_{ТЛ\text{ общ}} - 5,8 \pm 0,80$, ХВГ — $КО_{ТЛ\text{ общ}} - 7,2 \pm 1,10$, НАСГ — $КО_{ТЛ\text{ общ}} - 6,9 \pm 1,30$).

Отмечено, что развитие ПЭ у больных ХЗП происходит на фоне изменения биохимических параметров крови. С прогрессированием ПЭ установлено повышение цитолитического ($p < 0,05$), холестатического синдрома ($p < 0,05$), ПКН ($p < 0,05$). При ЛПЭ отмечалось незначительное снижение белково-синтетической функции печени ($p > 0,05$). У больных ХАЛГ и ХВГ, НАСГ выявлялась наибольшая активность показателей цитолитического и мезенхимально-воспалительного синдромов, у обследуемых лиц с АИГ — холестатического синдрома и ПКН.

Оценка иммунологических параметров крови выявила, что концентрация провоспалительных цитокинов IL-1b, IL-8 у пациентов ХЗП была достоверно выше, чем

в группе контроля, что свидетельствует об активном воспалении печеночной ткани, являясь отражением системной реакции организма, служа одним из показателей интенсивности иммунного ответа, активности ХЗП. При ЛПЭ отмечается незначительное увеличение IL-1b, IL-8, но существенных различий выявлено не было.

Изменения на ЭЭГ при ЛПЭ выявлены только у 36% больных — определялся деформированный α -ритм с частотой 8,5–12 колебаний в 1 сек, на фоне полиморфной дизритмии, что говорит в пользу того, что в диагностике ЛПЭ проведение ЭЭГ имеет вспомогательное значение.

Для изучения особенности изменения микробиоценоза толстой кишки у пациентов ХЗП с ПЭ обследовано 170 пациентов. Нарушение дисбиоза толстой кишки диагностировано у 98% обследованных. При ПЭ-0 стадии выявлялся дисбиоз 1 степени — 67%, у 3 больных (9%) изменений микробиоты толстой кишки выявлено не было. Тогда как у всех пациентов с ЛПЭ и ПЭ-1 отмечены изменения микробиоценоза толстой кишки. У пациентов с ЛПЭ одинаково наблюдается дисбиоз 1 степени — 38% и 2 степени — 40%. В нашем исследовании пациентов с ЛПЭ и 4-й степенью дисбиоза выявлено не было.

Нами выявлена корреляционная связь влияния степени дисбиоза на развитие ЛПЭ ($r = 0,46$, $p < 0,01$). У пациентов ХЗП с ПЭ-0 отмечено достоверное снижение общего числа *E. coli*, *Lactobacillus* и возрастание количества *S. aureus* и условно-патогенных бактерий (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter* и др.) ($p < 0,05$), по сравнению с группой контроля (табл. 1). При ЛПЭ выявлялось появление гемолитических *E. coli* (особенно в группах пациентов ХрАлГ и НАСГ — $0,39 \pm 0,18$ LgКОЕ/г и $0,21 \pm 0,10$ LgКОЕ/г) и грибов рода *Candida* — $0,87 \pm 0,18$ LgКОЕ/г (в большей степени у больных ХрВГ — $1,56 \pm 0,23$ LgКОЕ/г) ($p < 0,05$), диагностировалось снижение *Lactobacillus* ($p < 0,05$). Повышенное количество *S. aureus* и других условно-патогенных бактерий оставалось как в группе ПЭ-0 — их число было в 6 раз выше по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$) (табл. 1).

При сравнении нозологических форм ХЗП (АИГ, ХВГ, ХАЛГ, НАСГ) пациентов с ЛПЭ отмечено, что наибольшее изменение микробиоценоза толстой кишки наблюдалось у пациентов с ХАЛГ — выявлено наибольшее снижение числа *Lactobacillus* ($p < 0,05$) по сравнению с другими нозологическими формами, значительное, в 1,6 раза, увеличение титра *E. coli* со сниженной ферментативной активностью и грибов рода *Candida* — в 9 раз по сравнению с ПЭ-0 и группой контроля, также отмечено увеличение числа гемолитических *E. coli*, *Clostridium* и *S. aureus*. У пациентов с ХВГ с ЛПЭ отмечено снижение *Lactobacillus* — в 1,1 раза, умеренное увеличение количества *E. coli* со сниженной ферментативной активностью — в 1,3 раза и других условно-патогенных микроорганизмов — в 1,5 раза по сравнению с ПЭ-0 и группой контроля, при этом по сравнению

Таблица 1. Характер изменения микробиоценоза толстой кишки больных хроническими заболеваниями печени с печеночной энцефалопатией (M ± m)

Микроорганизмы, LgКОЕ/г	Группа контроля, n = 30	Стадии печеночной энцефалопатии		
		ПЭ-0, n = 33	ЛПЭ, n = 111	ПЭ-1, n = 34
Bifidobacterium	8,50 ± 0,13	8,47 ± 0,20	8,41 ± 0,13	8,17 ± 0,22
Lactobacillus	7,48 ± 0,26	6,33 ± 0,14 [к]	5,80 ± 0,13 [к,0]	6,22 ± 0,25 [к]
Clostridium	2,00 ± 0,40	2,12 ± 0,30	2,84 ± 0,30	3,03 ± 0,38
Общее количество E. coli	7,12 ± 0,14	6,44 ± 0,26 [к]	6,48 ± 0,20	6,47 ± 0,21 [к]
E. coli со сниженной ферментативной активностью	3,04 ± 0,60	3,78 ± 0,75	4,77 ± 0,54 [к]	5,27 ± 0,77 [к]
Гемолитические микроорганизмы (E. coli)	0 [#]	0 [#]	0,15 ± 0,07 [к, 0, 1]	0,67 ± 0,21 [к, 0, л]
Другие условно-патогенные бактерии *	0,23 ± 0,12	1,27 ± 0,32 [к]	1,54 ± 0,28 [к]	1,86 ± 0,22 [к]
S. aureus	0 [#]	0,33 ± 0,12 [к]	0,24 ± 0,07 [к, 1]	0,76 ± 0,13 [к, 0, л]
S. epidermidis	0,10 ± 0,05	0,12 ± 0,04	0,17 ± 0,10 [1]	0,86 ± 0,28 [к, 0, л]
Другие грибы рода Candida	0,10 ± 0,05	0,12 ± 0,03	0,87 ± 0,18 [к, 0, 1]	2,37 ± 0,31 [к, 0, л]

Примечания: * – представители родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter* и др.;

0[#] – микроорганизмы не обнаружены в объеме 0,1 г испражнений;

к – различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с результатами группы контроля;

0 – различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с результатами группы ПЭ-0;

л – различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с результатами группы ЛПЭ;

1 – различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с результатами группы ПЭ-1.

с АИГ, НАСГ, ХАЛГ, отмечена наибольшая численность *S. aureus* – в 1,8 раза ($p < 0,05$) и грибов рода *Candida* – в 2 раза ($p < 0,05$). При НАСГ диагностировано снижение уровня *Lactobacillus* – в 1,1 раза, появление гемолитических *E. coli*, грибов рода *Candida* по сравнению с ПЭ-0 и группой контроля. При АИГ отмечалось снижение числа *Lactobacillus* и преобладание других условно-патогенных микроорганизмов – в 1,3 раза больше по сравнению с ХАЛГ, ХВГ, НАСГ (рис. 1).

Выявлена прямая связь между степенью дисбиоза толстой кишки (повышенным числом гемолитических *E. coli*) и временем выполнения ТСЧ и ТЛ ($r = 0,33$, $p < 0,05$ и $r = 0,31$, $p < 0,05$), количеством грибов рода *Candida* ($r = 0,37$, $p < 0,05$ и $r = 0,34$, $p < 0,05$), *S. aureus* ($r = 0,24$, $p < 0,05$ и $r = 0,23$, $p < 0,05$) и обратная связь: между снижением уровня *Lactobacillus* и временем ТСЧ и ТЛ ($r = -0,30$, $p < 0,05$ и $r = -0,33$, $p < 0,05$).

Отмечено, что дисбиоз толстой кишки выявлялся также при ПЭ-0 у 21,2% больных, при ЛПЭ – у 16%, при ПЭ-1 – у 14,7% человек с отсутствием синдрома цитолиза, холестаза и сохранением белково-синтетической

функции печени по биохимическим показателям (АЛТ – $19,2 \pm 1,11$ Е/л, АСТ – $21,0 \pm 0,80$ Е/л, общий билирубин – $11,5 \pm 0,61$ мкмоль/л, ЩФ – $143,1 \pm 8,72$ Е/л, ГГТП – $26,5 \pm 2,07$ Е/л, общий белок – $75,5 \pm 1,52$ г/л, альбумин – $42,9 \pm 0,71$ г/л, ПТИ – $82,2 \pm 1,40\%$). Эту группу составили: 1 (4%) человек с АИГ, 5 человек (20%) с ХВГ (3 человека с ХВГ В и 2 человека с ХВГ С), 6 человек (24%) с ХАЛГ, 6 человек (24%) с НАСГ, у 7 человек (28%) диагностирована цирротическая стадия (2 человека – ХВГ В_{цп}, 1 человек – ХВГ С_{цп}, 4 человека – ХАЛГ_{цп}). Достоверно значимых корреляционных связей между признаками портальной гипертензии (ВРВ пищевода, гиперспленизм) и отечно-асцитическим синдромом у этих пациентов выявлено не было ($p > 0,05$). Отмечено, что на стадии ПЭ-0 дисбиоз 1-й степени диагностирован у 57%, при ЛПЭ – дисбиоз 2-й степени – 69%, ПЭ-1 – 3-й степени – 60% человек. С нарастанием степени дисбиоза прогрессировала ПЭ ($r = 0,49$, $p < 0,01$) за счет снижения содержания *Lactobacillus* ($r = -0,35$, $p = 0,05$) (при ПЭ-0 количество *Lactobacillus* составило $6,80 \pm 0,41$ LgКОЕ/г, ЛПЭ –

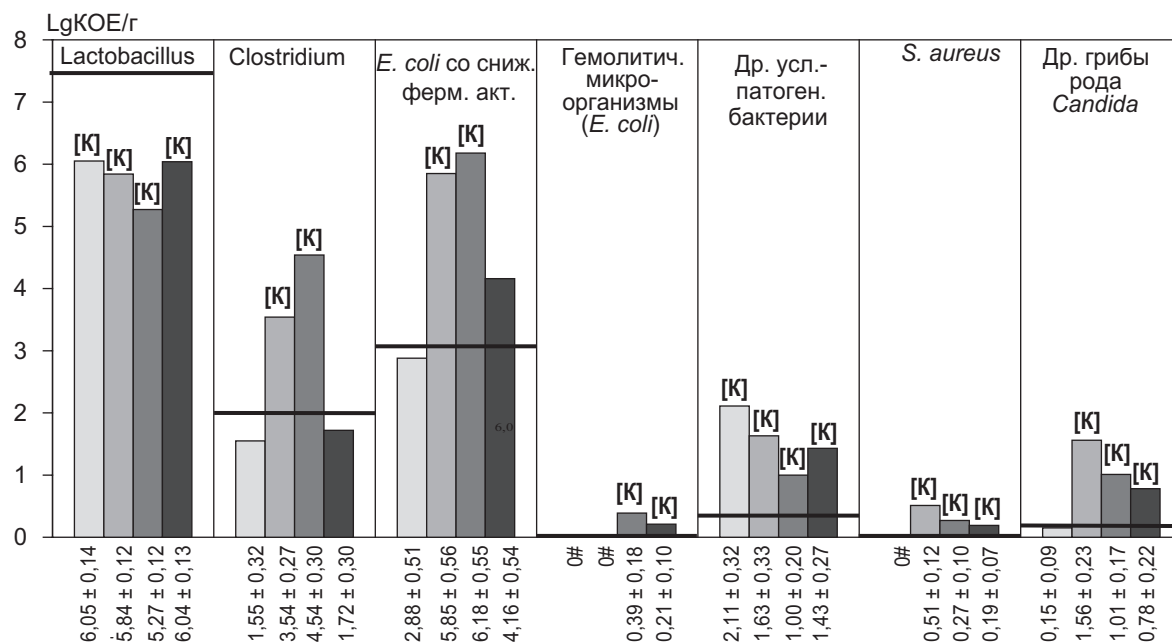


Рис. 1. Характер изменения микробиоценоза толстой кишки пациентов с различными нозологическими формами хронических заболеваний печени и латентной печеночной энцефалопатией

Примечания: □ – АИГ, ■ – ХВГ, ■ – ХАлГ, ■ – НАСГ, — — группа контроля, 0# – микроорганизмы не обнаружены в объеме 0,1 г испражнений;

К – различия статистически достоверны ($p < 0,05$) в группе ЛПЭ по сравнению с результатами группы контроля.

В группе контроля число *Lactobacillus* – $7,48 \pm 0,26$ LgKOE/г, *Clostridium* – $2,00 \pm 0,40$ LgKOE/г, *E. coli* со сниженной ферментативной активностью – $3,04 \pm 0,60$ LgKOE/г, гемолитические микроорганизмы (*E. coli*) – 0#, другие условно-патогенные бактерии (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter* и др.) – $0,23 \pm 0,12$ LgKOE/г, *S. aureus* – 0#, грибы рода *Candida* – $0,10 \pm 0,05$ LgKOE/г.

$6,15 \pm 0,41$ LgKOE/г, ПЭ-1 – $5,41 \pm 0,32$ LgKOE/г), достоверного увеличения *E. coli* со сниженной ферментативной активностью ($r = 0,42$, $p < 0,05$) (ПЭ-0 – $3,09 \pm 1,15$ LgKOE/г, ЛПЭ – $3,53 \pm 1,32$ LgKOE/г, ПЭ-1 – $7,14 \pm 1,14$ LgKOE/г), увеличения грибов рода *Candida* ($r = 0,61$, $p < 0,01$) (ПЭ-0 – рост не выявлен, ЛПЭ – $0,61 \pm 0,43$ LgKOE/г, ПЭ-1 – $3,30 \pm 0,85$ LgKOE/г) и увеличения роста гемолитических *E. coli* ($r = 0,32$, $p < 0,05$) (ПЭ-0 и ЛПЭ – рост не выявлен, ПЭ-1 – $0,57 \pm 0,31$ LgKOE/г). По результатам проведенного нами исследования пациентов ХЗП с ЛПЭ или ПЭ-1 с нормальным микробиоценозом толстой кишки выявлено не было, что предполагает, что развитие дисбиоза толстой кишки предшествовало развитию ЛПЭ, являясь его триггерным фактором, и позволяет включать анализ количественного и качественного состава показателей кишечного дисбиоза в комплексное обследование больных ХЗП с ПЭ с целью повышения качества диагностики и оценки проводимой терапии.

Получены корреляционные взаимосвязи между различными группами микроорганизмов в толстой кишке у больных ХЗП с ЛПЭ. Отмечена прямая связь между концентрацией *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* ($r = 0,41$;

$p < 0,05$), вероятно, обусловленного общими механизмами регуляции их численности. Увеличение количества *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, общего количества *E. coli* сочеталось со снижением содержания *Clostridium* и условно-патогенной микробиоты. Общее количество *E. coli* при ЛПЭ по сравнению с ПЭ-0 сохранялось за счет увеличивающегося числа *E. coli* со сниженной ферментативной активностью ($r = 0,59$, $p < 0,01$). Возрастающая численность грибов рода *Candida* и *S. aureus* ЛПЭ напрямую коррелировала с увеличивающимся количеством условно-патогенных бактерий родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и др. ($r = 0,5$, $p < 0,05$), что вероятно обусловлено наличием единых механизмов их содержания и факторов колонизации толстой кишки. Повышение количества гемолитических *E. coli* и др. условно-патогенных микроорганизмов при ЛПЭ было связано с проявлением астеновегетативного синдрома ($r = 0,32$ и $r = 0,44$; $p < 0,05$). Снижение *Lactobacillus* и возрастание числа грибов рода *Candida* ассоциировалось с проявлением синдрома кишечной диспепсии ($r = -0,50$, и $r = 0,33$; $p < 0,05$).

При анализе взаимозависимости между содержанием групп микроорганизмов в толстой кишке и лабораторными данными у больных ХЗП с ЛПЭ были выявлены

следующие особенности: установлена прямая связь активности АЛТ с количеством гемолитических *E. coli* ($r = 0,31; p < 0,05$). Активность АСТ на стадии ЛПЭ была прямо пропорциональна численности *Clostridium* ($r = 0,30; p < 0,05$), грибов рода *Candida* ($r = 0,64; p < 0,05$) и *E. coli* со сниженной ферментативной активностью ($r = 0,27; p < 0,05$). Снижение белково-синтетической функции печени (уменьшение уровня общего белка и альбуминов) коррелировало с повышенным числом *S. aureus* ($r = -0,37$, и $r = -0,40; p < 0,01$); снижение альбумина с уменьшением количества *Bifidobacterium* ($r = 0,45; p < 0,01$). Отмечена достоверная обратная связь между содержанием тромбоцитов, снижающихся при ЛПЭ, и числом *E. coli* со сниженной ферментативной активностью ($r = -0,37; p < 0,01$), *S. aureus* ($r = -0,30; p < 0,05$). Ускорение СОЭ коррелировало со снижением *Lactobacillus* ($r = -0,31; p < 0,05$) и увеличением *E. coli* со сниженной ферментативной активностью ($r = 0,33; p < 0,01$). Выявленные изменения у больных ХЗП свидетельствуют о том, что на фоне нарушений микробиотоза толстой кишки происходит усугубление нарушений функций печени, способствуя развитию более тяжелого состояния больных ХЗП и развитию ЛПЭ.

Для оценки клинического течения ЛПЭ у больных ХЗП использована шкала качества жизни SF-36. Установлено, что прогрессирование нервно-психической симптоматики сопровождается закономерным регрессом всех показателей КЖ ($p < 0,05$). Наибольшее их снижение наблюдалось у пациентов с ЛПЭ с дисбиозом толстой кишки 3-й степени. Детальный анализ профиля SF-36 показал у пациентов с ЛПЭ снижение качества жизни по результатам оценки суммы субсфер и на уровне основных шкал ($p < 0,05$). Наибольшее ухудшение параметров КЖ при ЛПЭ было отмечено по шкалам ГН (общего состояния здоровья) и VT (жизнеспособности), что нашло отражение в негативной оценке больными на данный момент своего состояния здоровья и перспектив на выздоровление. Полученные результаты подтверждают, что ЛПЭ у пациентов ХЗП является причиной преждевременного прекращения трудовой деятельности и фактором ограничения трудоспособности. Таким образом, церебральная дисфункция является детерминантом влияния заболевания на жизненную активность больного.

Учитывая, что развитие ЛПЭ у больных ХЗП зависит от характера изменения микробиоты толстой кишки, коррекция ЛПЭ проводилась с применением препаратов, восстанавливающих дисбиоз толстой кишки (Гепамин — группа 1, Мукофальк — группа 2, Ламинолакт — группа 3), и препарата с доказанным гипоаммониемическим действием (Дюфалак — группа 4 (сравнения 1)), по схеме, описанной выше. Группу 5 (сравнения 2) составили пациенты, получавшие гепатопротектор Эссенциале Форте Н.

По результатам исследования установлено, что у больных ХЗП с ЛПЭ на фоне применения Гепамина,

Мукофалька, Ламинолакта и Дюфалака регистрировалось уменьшение частоты и степени кишечного дисбиоза.

На фоне пре-/пробиотического лечения раньше всего положительная клиническая динамика зафиксирована у пациентов 1-й группы, получавших Гепамин, через 3–4 дня отмечалось уменьшение астеновегетативного синдрома, желудочной и кишечной диспепсии у 19 (73,0%) больных. В группах 2 (Мукофальк) и 3 (Ламинолакт) уменьшение астенического и диспепсического синдрома в среднем происходило к 6–7 дню от начала приема и наблюдалось также у 17 (68,0%) и 13 (65,0%) больных. В группе 4 (группе сравнения 1) к 4–5 дню на фоне приема Дюфалака уменьшение астеновегетативного синдрома, синдрома желудочной и кишечной диспепсии диагностировано у 14 человек (70,0%). В группе сравнения 2 (Эссенциале Форте Н) к 6–7 дню снижение диспепсического синдрома было у 4 (20,0%) больных. Через 4 недели больший процент пациентов, у которых полностью регрессировал астеновегетативный синдром, также отмечен в группе 1 — 88,4%.

Повышение работоспособности через 4 недели на фоне проводимого лечения отмечали 61,5% больных 1-й группы, 56,0% — 2-й группы, 55,0% — 3-й группы и 60,0% — 4-й группы. В группе сравнения 2 (Эссенциале Форте Н) повышение работоспособности отметили только 6 человек (30,0%).

На фоне проводимой терапии через 4 недели у пациентов 1, 2, 3-й групп значительно улучшилась белково-синтетическая функция печени. В группах лиц с ХЗП, дополнительно получавших пищевое волокно, через 1 месяц отмечен гипополипидемический эффект ($p < 0,05$), уменьшение значения индекса атерогенности (ИА). Гипополипидемический эффект у пациентов 1, 2 и 3-й групп обусловлен водорастворимым объем-формирующим компонентом пищевых волокон, связывающим желчные кислоты в тонкой кишке, снижая их реабсорбцию в терминальном отделе подвздошной кишки и увеличивая их экскрецию с калом. По мнению Rosendaal G. M. (2004) и Успенского Ю. П. (2006), потеря желчных кислот приводит к повышенному их образованию из холестерина и уменьшению его запасов внутри клеток. Растворимые объем-формирующие фракции пищевых волокон расщепляются кишечной микробиотой на короткоцепочечные жирные кислоты, ингибирующие ГМГ-КоА-редуктазу, снижая новый синтез холестерина.

Включение в комплексную терапию ХЗП с ЛПЭ средств, нормализующих микробиоту толстой кишки, приводило к уменьшению выраженности показателей холестаза (ЩФ ($p < 0,05$), ГГТП ($p < 0,05$)), цитолиза (АЛТ ($p < 0,05$), АСТ ($p < 0,05$), билирубина ($p < 0,05$)).

Применение пре-/пробиотического лечения в комплексной терапии пациентов ХЗП и ЛПЭ уменьшало выраженность показателей иммунного воспаления (IL-1b и IL-8, ЦИК, γ -глобулин), что может быть обусловлено уменьшением токсической и антигенной нагрузки на печень. Наибольшая тенденция к снижению показа-

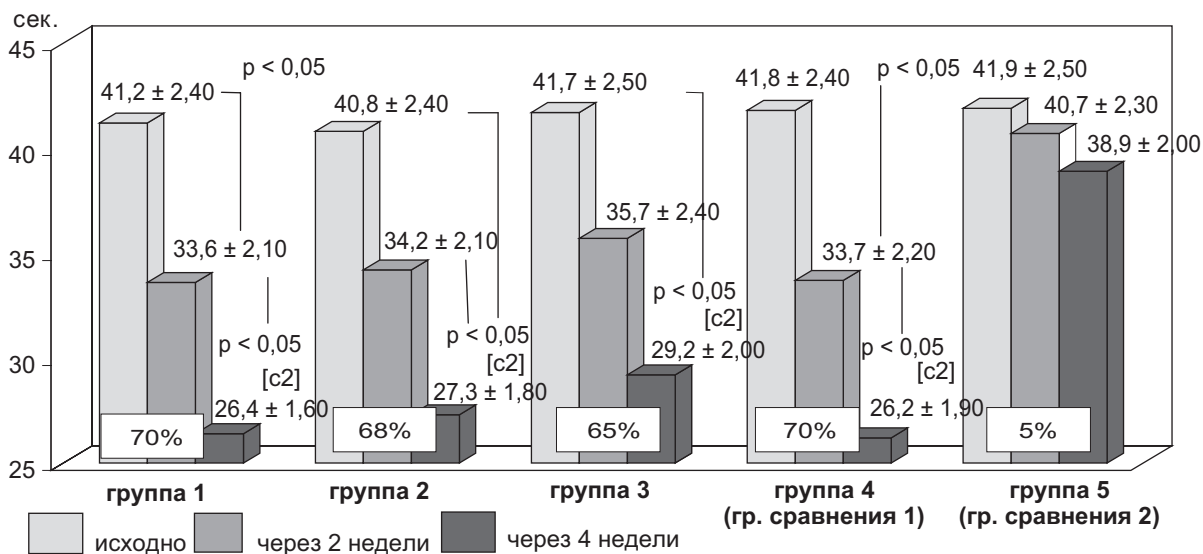


Рис. 2. Динамика психометрического тестирования больных хроническими заболеваниями печени с латентной печеночной энцефалопатией на фоне терапии через 2 и 4 недели (тест связи чисел)

Примечание: по оси абсцисс — группы пациентов, по оси ординат — время, необходимое для выполнения психометрического тестирования (ТСЧ), с2 — различия статистически достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с результатами группы 5 (группы сравнения 2) через 2 и 4 недели. Статистически достоверных различий в группах 1, 2, 3 по сравнению с группой 4 (сравнения 1) выявлено не было.

телей IL-1b в сыворотке крови наблюдалась у пациентов, получавшей Мукофальк. В группе 3, получавших Ламинолакт, отмечено увеличение противовоспалительного IL-10.

Анализ результатов выполнения психометрических тестов через 4 недели на фоне проводимой терапии подтвердил восстановление психомоторных функций у 18 (70%) больных 1-й группы, 17 (68%) и 13 (65%) пациентов 2-й и 3-й групп, 14 (70%) пациентов 4-й группы и 5% (1 человек) из группы сравнения (рис. 2)

Отмечена обратная корреляционная связь между временем ТСЧ и ТЛ и уровнем числа *Lactobacillus* у пациентов ХЗП с ЛПЭ ($r = -0,29; p < 0,05$ и $r = -0,20; p < 0,05$), прямая связь с повышением количества *S. aureus* ($r = 0,24; p < 0,05$ и $r = 0,23; p < 0,05$), грибов рода *Candida* ($r = 0,41; p < 0,05$ и $r = 0,36; p < 0,05$), и между временем ТСЧ и увеличением титра гемолитических *E. coli* ($r = 0,24; p < 0,05$). То есть восстановление микробиоценоза толстой кишки способствовало улучшению психомоторной функции и приводило к разрешению ЛПЭ.

Достоверное улучшение показателей ЭЭГ через 4 недели регистрировалось во всех группах: урежение частоты α -ритма сохранялось только у 15,0% лиц 1-й группы, у 20,0% — во 2, 3 и 4-й группах (против 45,0% группы сравнения 2). Восстановления амплитуды колебаний на фоне лечения не зарегистрировано. Данные многоуровневого нейродинамического анализа через 4 недели по индексам А, В1, С1, Д1 в группах 1, 2, 3 (получавших средства, нормализующие микробиоту толстой кишки) также подтверждают уменьшение проявления ЛПЭ (патент № 2462251 от 27.09.2012).

Восстановление микробиоценоза толстой кишки приводило к снижению токсической нагрузки на кишечник и печень. Снижался синтез эндогенного аммиака и выработка клетками печени и кишечника провоспалительных цитокинов, что в свою очередь приводило к обратному развитию и остановке процесса воспаления в основных органах детоксикации: кишечнике и печени, способствуя разрешению ЛПЭ. В результате исследования нами был установлен гипоаммониемический эффект препарата Мукофальк, способствующего разрешению ЛПЭ (получен патент на изобретение № 2462251 от 27.09.2012).

В группах 1 (Гепамин), 2 (Мукофальк) и 3 (Ламинолакт) отмечено достоверное повышение по шкалам VT (жизнеспособность), GH (общее здоровье), SF (социальное функционирование) ($p < 0,05$), показатели по шкалам RP (ролевое физическое функционирование) и RF (физическая активность) приблизились к аналогичным значениям группы здоровых лиц.

При анализе отдаленных результатов через 3 и 6 месяцев у пациентов ХЗП после пре-/пробиотической терапии отмечалось снижение *Lactobacillus* и увеличение числа условно-патогенных микроорганизмов, грибов *Candida* по сравнению с результатами на фоне пре-/пробиотического лечения; вновь отмечается увеличение времени выполнения ТСЧ и ТЛ; ухудшение психомоторных функций отмечено у 27% больных 2 группы, и 33% и 33% пациентов 3-й и 4-й групп по сравнению с результатом на фоне терапии.

При оценке качества жизни через 3 месяца в группах 1 (Гепамин), 2 (Мукофальк) и 3 (Ламинолакт) сохранял-

ся 50-балльный барьер по всем показателям, но при отдаленных результатах, через 6 месяцев после пре-/пробиотической терапии отмечено ухудшение показателей < 50-балльного барьера: RP — ролевого физического функционирования, GH — общего здоровья, VT — жизнеспособности. Отдаленные результаты, полученные через 3 и 6 месяцев после лечения, свидетельствуют о необходимости повторного приема препаратов, улучшающих микробиоту толстой кишки, через 3 месяца.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что нарушение микробиоценоза толстой кишки у больных ХЗП способствует формированию ЛПЭ. Фармакотерапия средствами, нормализующими микробиоту толстой кишки, в комплексном лечении ХЗП способствует разрешению, улучшая нейропсихические функции больных с восстановлением их социального уровня жизни.

Выводы

1. У больных хроническими заболеваниями печени с латентной печеночной энцефалопатией выявлены особенности состава микробиоты толстой кишки с преобладанием дисбиоза 1-й (38%) и 2-й (40%) степеней: при хроническом алкогольном гепатите — снижение числа бактерий рода *Lactobacillus*, увеличение *E. coli* со сниженной ферментативной активностью, гемолитических *E. coli*, *Clostridium* и грибов рода *Candida*; неалкогольном стеатогепатите — увеличение числа грибов рода *Candida*, гемолитических *E. coli* и *S. aureus*; хроническом вирусном гепатите В и С — повышение количества *S. aureus*, грибов рода *Candida*, *E. coli* со сниженной ферментативной активностью и условно-патогенных микроорганизмов; при аутоиммунном гепатите — преобладание условно-патогенных микроорганизмов (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*), снижение количества бактерий рода *Lactobacillus*.
2. Выявлена прямая корреляционная связь изменения микробиоценоза толстой кишки с развитием латентной печеночной энцефалопатии ($r = 0,46$; $p < 0,01$), показателями синдромов цитолиза ($p < 0,05$), холестаза ($p < 0,05$), печеночно-клеточной недостаточности ($p < 0,05$), проявлениями портальной гипертензии ($p < 0,05$). Дисбиоз толстой кишки у больных хроническими заболеваниями печени является триггерным фактором развития латентной печеночной энцефалопатии, что способствует ухудшению качества жизни пациентов за счет снижения социальной активности и физического компонента здоровья.
3. У больных хроническими заболеваниями печени установлена эффективность использования средств, нормализующих микробиоту толстой кишки, «Гепамин», «Мукофальк», «Ламинолакт» для коррекции латентной печеночной энцефалопатии.

Литература

1. Ивашкин В. Т. Алкогольные и вирусные заболевания: практическое руководство. М.: Литтерра, 2007: 159 с.
2. Дуданова О. П. Диагностика хронических гепатитов. Петрозаводск, 2010: 127 с.
3. Селиверстов П. В. Дисбиоз кишечника и пути коррекции у больных хроническими заболеваниями печени: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2011: 23 с.
4. Dam-Larsen S. et al. Long-term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death // Gut. 2004; 53: 750–755.
5. Буеверов А. О., Маевская М. В. Трудные вопросы диагностики и лечения печеночной энцефалопатии // Клинические перспективы гастроэнтерологии и гепатологии. 2005; 1: 25–30.
6. Herber T. H. Schomerus Hepatic encephalopathy in liver cirrhosis. Pathogenesis diagnosis and management // Drugs, 2000; 60 (6): 1353–1370.
7. Butterworth R. F. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at ammonia // Metab. Brain Dis. 2002; 17 (4): 221–227.
8. Weissenborn K., Weissenborn K., Zakim D., Boyer T. D. Clinical features of hepatic encephalopathy // Hepatology — A Textbook of Liver Disease. Philadelphia, London, N-Y, St. Louis, Sydney, Toronto: W. B. Saunders, 2003; 1: 431–444.
9. Царегородцева Т. М. и соавт. Интерлейкины при хронических заболеваниях органов пищеварения // Терапевтический архив. 2003; 2: 7–9.
10. Ивашкин В. Т., Надинская М. Ю., Буеверов А. О. Печеночная энцефалопатия и методы ее метаболической коррекции // Болезни органов пищеварения, 2001; 3: 25–27.
11. Тетерина Л. А., Радченко В. Г., Козлов В. К. и соавт. Пути коррекции латентной печеночной энцефалопатии у пациентов хроническими заболеваниями печени: усовершенствованная медицинская технология // СПб., 2010: 39 с.
12. Чихачева Е. А., Тетерина Л. А., Селиверстов П. В. и соавт. Микробиоценоз кишечника при хронических заболеваниях печени: диагностика и лечение // Врач. 2011; 7: 18–21.
13. Богомолов П. О., Петраков А. В. Коррекция печеночной энцефалопатии: патофизиологические основы применения пребиотиков // Consilium medicum. 2006; 8 (7): 18–20.
14. Надинская М. Ю. Современные подходы к лечению печеночной энцефалопатии // Клини. перспективы гастроэнтерол., гепатол. 2001; 6: 16–23.
15. Ивашкин В. Т. Болезни печени и желчевыводящих путей: руководство для врачей. М.: Вести, 2005: 536 с.
16. Надинская М. Ю. Латентная печеночная энцефалопатия: как помочь пациенту // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. 2001; 1: 10–17.
17. Häussinger D. Hepatische enzephalopathie // Schweiz. Rundsch. Med. Praxis. 2002; 91: 957–963.
18. Бондаренко В. М., Мацулевич Т. В. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007: 304 с.
19. Ткаченко Е. И., Суворов А. Н. Дисбиоз кишечника: руководство по диагностике и лечению. СПб., 2009: 35 с.
20. Шендеров Б. А. Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома. М.: ДеЛи-принт, 2008: 319 с.
21. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 9 июня 2003 года № 231 «Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника»» (ОСТ 91500.11.0004–2003).
22. Парфенов А. И., Осипов Г. А., Богомолов П. О. Дисбактериоз кишечника // Гастроэнтерология, Consilium medicum (прил.). 2001; 3 (6): 270–273.

23. Шептулин А. А. Синдром избыточного роста бактерий и «дисбактериоз кишечника»: их место в современной гастроэнтерологии // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 1999; 3: 51–55.

24. Закиров И. Г. Дисбактериоз кишечника при хронических вирусных гепатитах. Казань, 2003: 86 с.

25. Гриневич В. Б. и соавт. Клинические аспекты диагностики и лечения дисбиоза кишечника в общетерапевтической практике: учебно-методическое пособие. СПб.: Валмед, 2002: 35 с.

26. Захарченко М. М. Диагностика и коррекция нарушений кишечного микробиоценоза у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки неосложненного течения: автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2003: 20 с.

27. Nagayama K. et al. Characteristics of hepatitis C viral genome associated with disease progression // Hepatology. 2000; 31: 745–750.

28. Wiest R., Garcia-Tsao G. Bacterial translocation in cirrhosis // Hepatology. 2005; 41 (3): 422–33.

29. Persico M. et al. Natural history of hepatitis C virus carriers with persistently normal aminotransferase levels // Gastroenterol. 2000; 118: 760–764.

30. Парфенов А. И., Осипов Г. А., Богомолов П. О. Дисбактериоз кишечника // Гастроэнтерология, Consilium medicum (прил.). 2001; 3 (6): 270–273.

31. Селиверстов П. В. и соавт. Коррекция нарушений микробиоценоза кишечника на фоне хронических заболеваний печени // Врач. 2011; 3: 18–24.

32. Ардатская М. Д. Диагностическое значение содержания короткоцепочечных жирных кислот при синдроме раздражённого кишечника // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2000; 3: 36–41.

33. Forton D. et al. Fatigue and primary biliary cirrhosis: association of globus pallidus magnetisation transfer ratio measurements with fatigue severity and blood manganese levels // Gut. 2004; 53: 587–592.

34. Häussinger D. Hepatische enzephalopathie // Schweiz. Rundsch. Med. Praxis. 2002; 91: 957–963.

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

МЕДИЦИНСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЛАЗЕРОВ

В.А. ПАРФЕНОВ¹, И.А. ЮДИН²

¹ Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ», Санкт-Петербург

² ОАО «Завод Магнетон», Санкт-Петербург

Резюме. Приведен краткий обзор современных применений лазеров в медицине. Показаны новые тенденции использования лазеров при диагностике заболеваний, основанные на использовании оптической когерентной томографии и методов адаптивной оптики. Подробно рассмотрены методы создания синтетических имплантатов для протезирования внутренних органов и конечностей, основанные на использовании лазерных технологий 3D-сканирования и быстрого прототипирования (в том числе, лазерной стереолитографии и лазерного селективного спекания).

Ключевые слова: адаптивная оптика, быстрое прототипирование, диагностика, имплантаты, лазерная стереолитография, лазерное 3D-сканирование, лазеры, медицина, селективное лазерное спекание, спектрометрия, томография.

LAZERS IN MEDICINE

V.A. PARFENOV¹, I.A. JUDIN²

¹ Saint-Petersburg State Electrotechnical University "LETI", Saint-Petersburg

² OAO "Plant Magneton", Saint-Petersburg

Summary. The review of modern aspects of lasers use in medicine is given, including the new trends of lasers use in diagnostics, based on optic coherent tomography and adaptive optics. The article gives the detailed review of creation methods for synthetic implants used for prosthesis (extremities and inner organs prostheses), based on laser technologies, 3D skanning and rapid prototyping including laser stereolytography and laser selective agglomeration.

Key words: adaptive optics, rapid prototyping, diagnostics, implants, laser stereolytography, medicine, selective laser agglomeration, spectrometry, tomography.

Данные для корреспонденции

Парфенов Вадим Александрович, канд. техн. наук (2002), доцент кафедры ЛИНС СПбГЭТУ («ЛЭТИ») 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 5, тел.: 8 (921) 752-78-53, e-mail: vadim_parfenov@mail.ru

Введение

Первые клинические применения лазеров в медицине начались на самом раннем этапе развития лазерной техники — в 1962 году [1]. К настоящему времени круг этих применений вырос настолько, что можно говорить о появлении отдельного направления науки и техники — лазерной медицины. Сегодня лазеры используются практически во всех разделах современной медицины, включая хирургию, ангиологию, гематологию, гинекологию, дерматологию, венерологию, кардиологию, микробиологию, неврологию, онкологию, ортопедию, ото-

риноларингологию, офтальмологию, стоматологию, терапию, травматологию, урологию и др. Большинство этих применений хорошо известно и подробно описано в научной литературе [2, 3]. В данной статье приведен краткий обзор новейших областей использования лазерной техники в медицине.

Лазерная диагностика

Диагностика заболеваний, особенно на их ранних стадиях, является одной из важнейших задач современ-

ной медицины. Эффективность лечения непосредственно зависит от точности поставленного диагноза, что в свою очередь предъявляет высокие требования к диагностическому оборудованию. Медицинская диагностика состоит из нескольких этапов: 1) определение заболевания; 2) подбор правильного лечения; 3) мониторинг лечения и в некоторых случаях — обследование после его завершения. По сложившейся традиции, лазерная диагностика подразделяется на два направления: *ex vivo* и *in vivo*.

Оптическая диагностика или оптическая биопсия — современный метод для диагностирования различных заболеваний. Существует множество различных методов лазерной диагностики: интерферометрические и голографические, абсорбционные и калориметрические методы, рэлеевское рассеяние, лазерная спектроскопия Рамановского рассеяния, лазерный флуоресцентный анализ и оптическая когерентная томография [4, 5, 6, 7]. Эффективность перечисленных методов определяется характером взаимодействия фотонов света внутри объекта исследования и на границе с окружающей средой.

Оптическая томография

К числу наиболее эффективных и перспективных лазерных методов диагностики в медицине относится оптическая томография (ОТ). ОТ позволяет получать изображения биологических тканей с пространственным разрешением, сравнимым с длиной волны зондирующего излучения. Возможность подбора характеристик детектируемого излучения порождает многообразие подходов к получению информации. Существует несколько методов ОТ, имеющих общую схему измерения, основанную на последовательном измерении характеристик прошедшего или отраженного зондирующего излучения. При применении любых методов лазерной диагностики существует ряд проблем, одна из которых связана с особенностями распространения света в тканях. Биоткани характеризуются интенсивным рассеянием излучения видимого и ближнего ИК диапазонов и в ряде случаев — селективным поглощением, обусловленным наличием в составе тканей естественных хромофоров (в первую очередь гемоглобина и меланина). Для преодоления такого рода трудностей было разработано несколько направлений ОТ: оптическая диффузионная томография (ОДТ), предоставляющая возможность визуализации крупномасштабных объектов (томография мозга и маммография); морфологические исследования относительно тонких (менее 1 мм) слоев биотканей с помощью когерентных и поляризационных методов, а также оптическая когерентная томография.

Оптическая когерентная томография (ОКТ) позволяет получать изображения биологических микроструктур с латеральным пространственным разрешением в несколько микрон, которое ограничивается исключительно длиной когерентности излучения лазера. Метод ОКТ был разработан в 1991 году в Массачусетском тех-

нологическом институте [8]. Существует много его потенциальных применений, однако сегодня он наиболее часто применяется в офтальмологии, кардиологии и онкологии. В настоящее время ОКТ — один из главных инструментов, используемых при устранении разнообразных расстройств макулярной области сетчатки глаза. ОКТ позволяет строить изображения микроструктурной морфологии сетчатки человеческого глаза и является прецизионным средством измерения объемов и расстояний во всех ретинальных и субретинальных областях. В ОКТ используются два различных алгоритма работы: первый реализует временную задержку и позволяет проводить измерения отраженного или рассеянного света; второй строит изображение сетчатки в ее поперечном сечении [9]. С помощью ОКТ можно получать изображения зрительного нерва или слоя нервных волокон сетчатки, определять скорость прогрессирования болезни и оценивать результаты проведенной хирургической операции. В кардиологии ОКТ используется для изучения структурной целостности сердечно-сосудистой системы, клеточного и молекулярного анализа. Применение ОКТ в области онкологии позволяет диагностировать широкий спектр злокачественных новообразований на ранней стадии их развития.

Лазерные анализаторы

Иммунофенотипированный анализ — важный метод раннего диагностирования различных заболеваний (острый лейкоз, хронические лимфопролиферативные заболевания, злокачественная лимфома и др.). К числу таких методов относится, в частности, метод проточной цитометрии, который заключается в исследовании клеток при помощи моноклональных антител или иных зондов, позволяющих получить представление о типе клеток и их функциональном состоянии по наличию того или иного набора клеточных маркеров. Применение данного метода позволяет получать сведения о состоянии пациента, исследовать природу некоторых заболеваний и прогнозировать дальнейшее развитие болезни.

Лазерные цитометры

Впервые технология анализа клеток в потоке жидкости была описана Уоллесом Коултером в 1950 году [10], однако первые коммерческие образцы проточных цитометров появились лишь двадцать лет спустя и обладали рядом серьезных недостатков (высокая стоимость, сложность управления, большие габаритные размеры). Переход к использованию лазерных излучателей позволил сделать современные цитометры компактными и простыми в использовании приборами. Принцип действия проточного лазерного цитометра основан на измерении коэффициента рассеяния клетки, движущейся в струе жидкости. Общая схема проточного цитометра представлена на рисунке 1.

Система построена таким образом, что имеет проточную ячейку в виде тонкого прозрачного капилляра. Благодаря гидродинамической фокусировке создаются

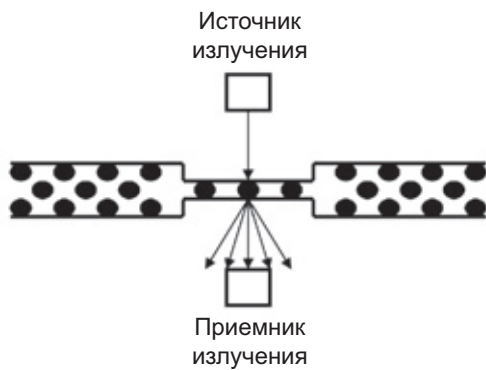


Рис. 1. Схема проточного цитометра

условия ламинарного потока без перемешивания суспензии клеток: клетки движутся друг за другом и пересекают лазерный пучок, что приводит к рассеянию излучения. При измерениях с использованием данного прибора определяется уровень флуоресценции химических соединений, входящих в состав клетки (аутофлуоресценция) или специально введенных в исследуемый образец. Скорость потока составляет от 30 до 40 км/ч, что обуславливает высокую производительность метода по сравнению со стандартными лабораторными подходами. Рассеянный свет детектируется фоточувствительным элементом. В качестве источника излучения применяют аргоновый, гелий-неоновый и криптоновый лазеры. Проточный цитометр позволяет проводить анализ крови, костного мозга, ликвора, суставной плевральной и асцитической жидкостей [11].

Данный метод находит применение в иммунологии (иммунофенотипирование клеток периферической крови, определение фагоцитарной активности, определение внутриклеточных цитокинов, определение внутриклеточных белков, определение пролиферативной активности, исследование клеточного цикла, оценка клеточной цитотоксичности), онкологии (количественный анализ ДНК, выявление анеуплоидного клона, определение специфических маркеров, оценка состояния иммунной системы), цитологии (определение цитоморфологической принадлежности клетки, оценка активности внутриклеточных ферментов, определение экспрессии поверхностных антигенов, измерение физиологических параметров клетки) и гематологии (подсчет ретикулоцитов, анализ тромбоцитов по специфическим маркерам, диагностика лимфопролиферативных заболеваний, диагностика острых лейкозов, оценка минимальной резидуальной болезни).

Альтернативой классическому методу лазерной цитометрии является газоаналитический метод. В продуктах кислородного обмена содержится около 600 различных химических соединений. В результате анализа их концентрации можно получить данные об уровне гемоглобина, обнаружить хронические инфекционные воспаления, сахарный диабет и инфекции дыхательных путей [12].

Метод неинвазивной спектроскопии

Метод неинвазивной спектроскопии (МНС) позволяет проводить диагностику в условиях живого организма и не требует предварительной подготовки образцов. МНС включает: лазерную доплеровскую диагностику (ЛДФ), лазерную флуоресцентную диагностику (ЛДФ) и оптическую тканевую оксиметрию. ЛДФ является наиболее отработанным методом МНС и позволяет проводить диагностику мелкососудистого кровотока. Луч лазера направляется на участок кожи, под которым находится близкорасположенный сосуд. Свет, отраженный от поверхности кожи, не имеет частотного сдвига, в то время как свет, отраженный от движущихся клеток (например, красные кровяные тельца), приобретает доплеровский сдвиг частоты. Степень сдвига прямо пропорционально зависит от скорости кровотока, что и позволяет проводить ее измерения. Данный метод применяется для дифференциальной диагностики патологий различных заболеваний лимфатических и артериальных сосудов, исследования влияния методов лечения на мозговое кровоснабжение и др.

Исследование сетчатки глаза с помощью методов адаптивной оптики

Зрение — это сложная система формирования и обработки изображений окружающего мира. Главным сенсорным органом зрительной системы является глаз. Современная офтальмология рассматривает глаз как сложную оптическую систему, которая обладает такими дефектами, как астигматизм и оптические aberrации. Применение методов адаптивной оптики позволяет решить проблему коррекции aberrаций волнового фронта глаза, а, следовательно, улучшить качество изображения. На рисунке 2 представлена общая схема оптической системы с применением адаптивных зеркал для коррекции искажений волнового фронта.

Свет от источника излучения (лазера) фокусируется на поверхности сетчатки человеческого глаза. Адаптивное зеркало корректирует искажения волнового фронта, индуцированные aberrациями оптической системы глаза.

В октябре 2012 года Дэвид Уильямс впервые представил научной общественности адаптивную оптическую систему, которая позволяет снизить рефракционные ошибки в 10 раз [13]. Свет, отраженный от сетчатки, фокусируется на устройстве, которое называется датчиком волнового фронта и служит для измерения оптических aberrаций. Эта информация используется для изменения формы поверхности адаптивного зеркала, в результате чего и происходит коррекция искажений волнового фронта. С применением методов адаптивной оптики (АО) были получены высококачественные изображения сетчатки глаза: колбочек (латеральное разрешение около 5 мкм) и палочек (разрешение 2 мкм).

Применение методов адаптивной оптики (АО) позволяет улучшить возможности и других диагностиче-

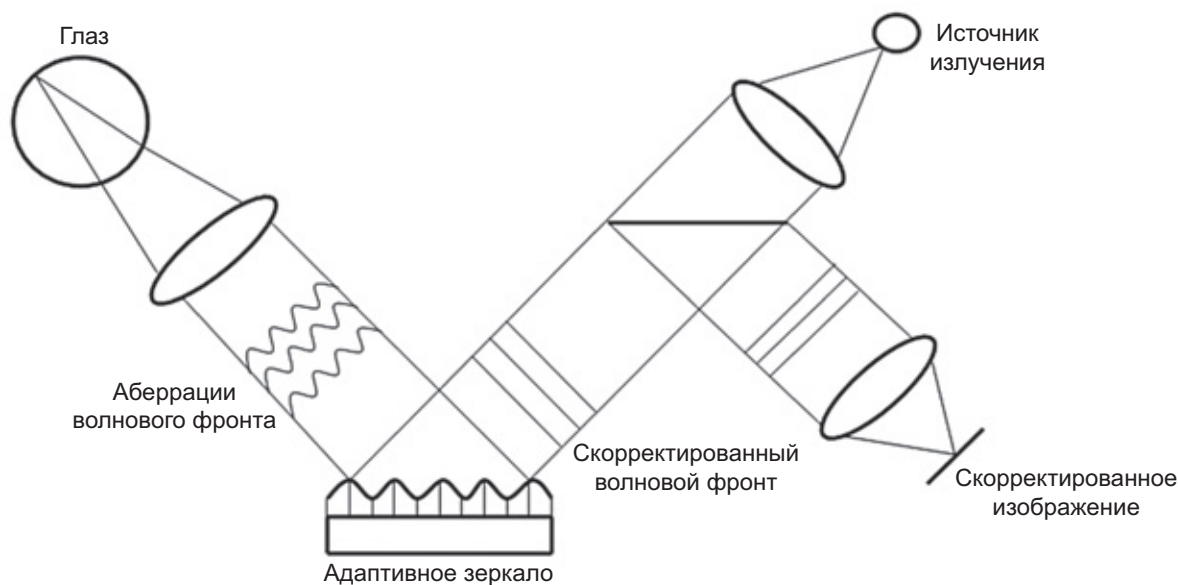


Рис. 2. Схема адаптивной оптической системы

ских приборов. Так, латеральное разрешение сканирующего лазерного офтальмоскопа, дополненного адаптивными зеркалами, составляет менее 2 мкм. Кроме того, методы АО позволяют усовершенствовать и метод ОКТ (его латеральное разрешение может быть увеличено до 3 мкм).

Традиционные средства измерения остроты зрения не позволяют обнаруживать серьезные деградации глаза, так как зрительная система человека весьма устойчива к потере фоторецепторов. Построение изображения поверхности сетчатки может играть очень важную роль в лечении некоторых серьезных заболеваний зрительной системы. С применением методов АО можно получить данные о количестве клеток на сетчатке пациента. Проведение повторных измерений позволяет установить скорость прогрессирования болезни и составить прогноз о ее дальнейшем развитии. В качестве примера применения такого подхода можно привести мониторинг прогрессирования пигментного ретинита — редкого наследственного заболевания, обусловленного постепенной дегенерацией сетчатки.

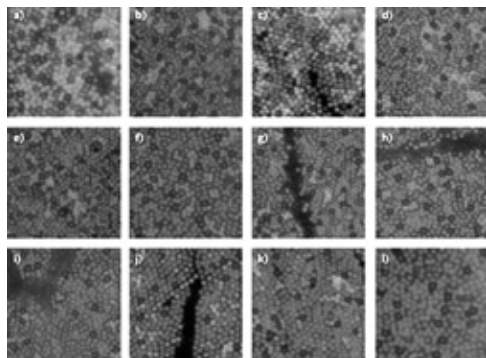


Рис. 3. Фоторецепторная мозаика

Исследование самого органа зрения также играет очень важную роль. Ганглиозные клетки — это нервные клетки, расположенные на сетчатке глаза, способные генерировать электрические импульсы. Аксоны ганглиозных клеток направляются к пятну Марииотта и образуют зрительный нерв. Следовательно, ганглиозные клетки играют важную роль в системе формирования и передаче зрительной информации в головной мозг. Увеличение разрешающей способности фундус-камеры, достигнутое с помощью АО-коррекции изображения сетчатки глаза, позволило получить данные о количестве ганглиозных клеток на поверхности сетчатки (которое составило 1,2 млн клеток), а также разделить их на 17 различных классов. Дэвид Уильямс и Билл Мериган в течение года наблюдали активность ганглиозных клеток и установили, что во время передачи нервных импульсов ганглиозные клетки начинают светиться [14]. Конечно, предстоит узнать еще очень многое о ганглиозных клетках, однако уже сейчас установлено, что некоторые заболевания зрительной системы, например, глаукома, провоцируют их гибель.

В течение длительного времени возможности исследования органа зрения были ограничены по причине того, что используемое оборудование не позволяло исследовать восприятие света одиночной фоторецепторной клеткой. Однако оптическая коррекция, основанная на использовании методов АО, позволяет осуществить фокусировку фундус-камеры на одиночном фоторецепторе, что открывает новые уникальные возможности в этой области.

Существует несколько областей применений АО для исследования органа зрения. Первый — построение топографической карты распределения красных, зеленых и синих колбочек. Это распределение, в основном, носит случайный характер, однако было установлено, что от-

ношение красных колбочек к зеленым составляет 1 к 40. Второе применение — понимание зрительного процесса на клеточном уровне. Так, стимуляция колбочек на разных длинах волн зондирующего излучения дала удивительные результаты. Ранее считалось, что каждый тип колбочек ответственен за восприятие одного цвета и если на колбочки, чувствительные к красному свету, попадет желтый свет, то мозг человека все равно получит информацию только о красном свете. Однако опытным путем было установлено, что при фокусировке лазерного излучения с длиной волны 580 нм на одиночном фоторецепторе человек может увидеть семь разных цветов, но отнюдь не предполагаемые красный, зеленый и синий [15]! Третье применение — это исследование дальтонизма. Многие специалисты считали, что за этот дефект зрения отвечают различные наборы генов, однако дифференциальный подход к набору генов не рассматривался. Джо Кэрролл использовал адаптивную оптику для получения профиля распределения колбочек на сетчатке глаза человека, страдающего дальтонизмом. В результате было установлено, что мозаика колбочек людей с одним генетическим образцом выглядит совершенно нормально, в то время как у людей с другим генетическим образцом — пропущены определенные типы колбочек [16].

Хотя применение адаптивной оптики открывает широчайшие перспективы для исследования органа зрения и лечения различных заболеваний, существует серьезная проблема, которая пока сдерживает широкое внедрение этой техники в офтальмологию. Речь идет о высокой стоимости адаптивных оптических систем. Поэтому прогресс развития и внедрения современных фундус-камер на основе АО в медицину будет во многом зависеть от экономических факторов.

Применение лазеров при создании имплантатов

В последние годы в медицине произошел значительный прогресс в области создания и применения имплантатов. В настоящее время существует несколько главных областей применения имплантатов: стоматологические имплантаты, индивидуальные имплантаты для пластической хирургии, синтетические имплантаты для замены внутренних органов и конечностей (протезирование). О высоком уровне развития технологии имплантатов говорит тот факт, что сегодня уже существуют мозговые имплантаты, предназначенные для вживления в мозг человека с целью регистрации мозговых импульсов и стимулирования нейронной активности [17]. Кохлеарный имплантат позволяет частично или полностью восстановить слух некоторым пациентам с выраженной или тяжелой степенью нейросенсорной тугоухости [18].

Значительный прогресс в технологии создания имплантатов был достигнут в последние годы, в том числе, благодаря внедрению в эту сферу лазерного 3D-сканирования. Это позволило значительно повысить точность изготовления индивидуальных имплантатов и одновре-

менно привело к значительному упрощению технологического процесса. Дело в том, что крайне важным требованием современного протезирования является необходимость изготовления высокоточных копий оригинала. Следует заметить, что данное требование касается в первую очередь протезирования конечностей, органа зрения и зубов. Во всех случаях это важно не только с эстетической точки зрения. Эксплуатация имплантата, который по своим геометрическим размерам наиболее приближен к утраченному органу, существенно упрощается, а, следовательно, заметно улучшается качество жизни инвалида [19].

Основным требованием к лазерным сканерам при их использовании для изготовления имплантатов является создание 3D-модели с максимально возможной точностью. По этой причине обычно применяют лазерные сканеры, принцип действия которых основан на использовании метода оптической триангуляции. Такие сканеры позволяют производить измерения координат отдельных точек поверхности измеряемого объекта с микронной точностью. Создаваемая в результате сканирования 3D-модель представляет собой компьютерный файл, который содержит данные об объеме сканируемого объекта, площади его поверхности и геометрической форме измеряемого объекта.

К числу областей медицины, где использование технологии имплантатов (в том числе, изготовленных с помощью 3D-сканирования) является наиболее востребованным, относится стоматология. Однако существуют другие не менее важные области ее применения. В их числе можно упомянуть, например, изготовление грудных протезов.

Рак молочной железы (РМЖ) — это злокачественная опухоль железистой ткани молочной железы, наиболее часто встречающаяся форма рака среди женщин. В 2008 году было зафиксировано 1,4 млн случаев РМЖ, почти 460 тыс. женщин погибло [20]. По статистике рак молочной железы занимает второе место в мире, после рака легких. В течение 70 лет мастэктомия считалась стандартом хирургического лечения РМЖ. По частоте использования эта операция, даже на сегодняшний день, занимает первое место. Суть операции заключается в удалении молочной железы, жировой клетчатки и в зависимости от вида мастэктомии — удалении малой и/или большой грудной мышцы. Результатом радикальной операции становится полное удаление груди. Для создания индивидуального имплантата, максимально приближенного по своей форме к молочной железе, которая подлежит удалению в ходе предстоящей операции, выполняется полное 3D-сканирование грудной клетки (см. схему на рисунке 4). Область сканирования должна охватывать верхнюю, нижнюю и боковые границы грудной области.

В процессе сканирования лазерный пучок с помощью системы развертки луча движется по поверхности грудной клетки и проводит измерение ее координат в от-

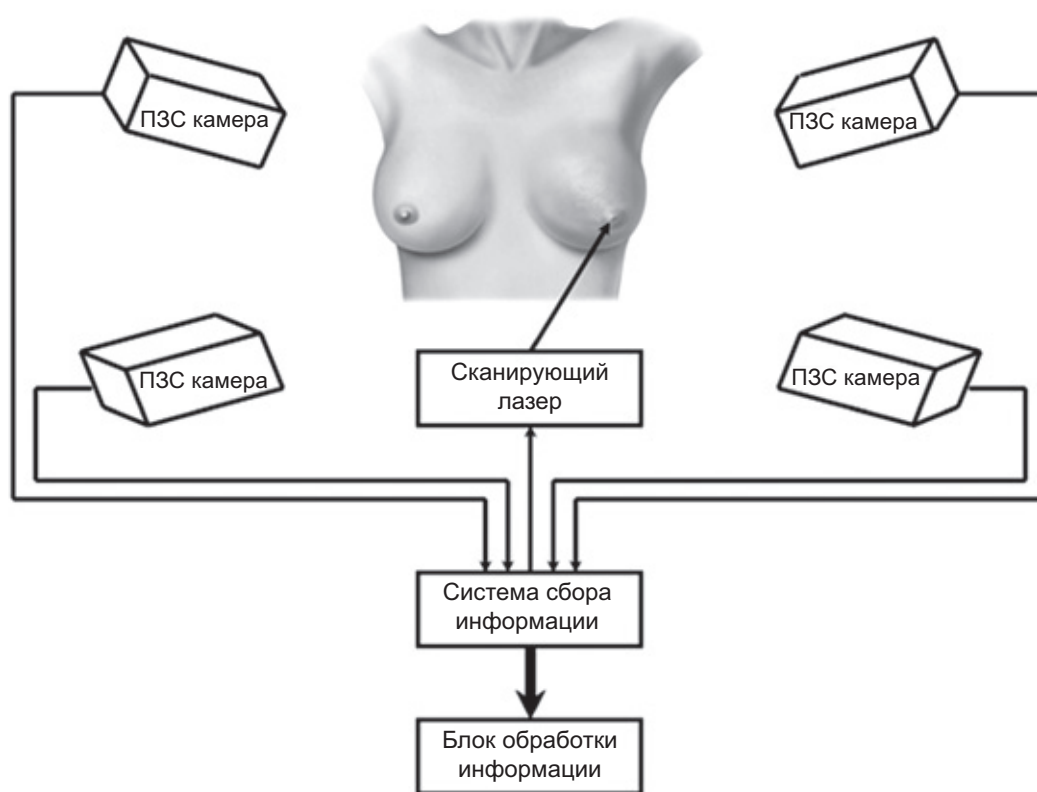


Рис. 4. Лазерное 3D сканирование грудной клетки

дельных точках. Чем ближе точки, в которых производятся измерения координат по трем осям (X, Y, Z), тем выше точность 3D-модели, которая представляет собой так называемое облако точек. Поскольку обработка данных лазерного сканирования чаще всего осуществляется программистом «вручную», на этапе создания 3D-модели в соответствии с требованиями хирурга или самого пациента возможна корректировка формы молочной железы.

Для сканирования частей человеческого тела обычно используются лазерные 3D-сканеры триангуляционного типа, обеспечивающие точность измерений на уровне 50–150 мкм. В качестве источника излучения в таких сканерах (в том числе сканерах, используемых при сканировании грудной клетки) обычно используют полупроводниковый лазер с длиной волны 650 нм и мощностью излучения около 5 мВт. При сканировании груди существует серьезная проблема, связанная с точностью измерений лазерного сканера. Во время дыхательного процесса грудная клетка интенсивно сужается и расширяется (средняя величина смещения составляет 2 мм, а частота вдохов — 12 в минуту), что может приводить к погрешности измерений. Однако данная проблема решается с помощью методов пространственной фильтрации [21].

Другая очень серьезная проблема заключается в том, что в некоторых случаях оказывается невозможным вы-

полнить сканирование протезируемого органа. Но эта проблема решается следующим образом. Если у человека отсутствует, например, один из пальцев правой руки, можно провести сканирование соответствующего пальца левой руки. После создания его 3D-модели ее необходимо инвертировать (т.е. получить зеркальное отображение). Далее методом быстрого прототипирования (подробнее об этом будет сказано ниже) изготавливают точную копию утраченного пальца из синтетического материала. Качество получаемых таким образом имплантатов столь высоко, что они могут воспроизводить даже поверхностную структуру кожи данного конкретного человека. Таким образом, применение лазерного 3D-сканирования позволяет получать протезы, по своим свойствам и визуальному восприятию совершенно идентичные утраченным конечностям.

Современные медицинские имплантаты могут быть использованы для замены практически любого органа. К материалам для изготовления медицинских имплантатов предъявляется ряд особых требований: устойчивость к коррозии, биосовместимость, биоадгезия, биофункциональность, обрабатываемость и доступность. Технология создания современных медицинских имплантатов базируется на системах автоматизированного проектирования.

Тканевая инженерия позволяет создавать новые ткани и органы для терапевтической реконструкции по-

врежденного органа посредством доставки в нужную область опорных структур, клеток, молекулярных и механических сигналов для регенерации. Обычные имплантаты из инертных материалов могут устранить только физические и механические недостатки поврежденных тканей. Целью тканевой инженерии является восстановление биологических (метаболических) функций, т. е. регенерация ткани, а не простое замещение ее синтетическим материалом. В настоящее время для изготовления тканеинженерного имплантата используются технологии быстрого прототипирования.

Технология быстрого прототипирования — технология формирования трехмерных объектов путем постепенного наращивания слоев материала или изменения фазового состояния вещества в заданной области пространства. Наиболее развитой технологией быстрого прототипирования является технология лазерной стереолитографии (ЛС) [22], основанная на инициированной лазерным излучением полимеризации жидких фотополимеризующихся композиций (ФПК). Данная технология имеет существенный недостаток, ограничивающий ее применение в медицине, — компоненты ФПК (акриловые или эпоксидные мономеры, низкомолекулярные олигомеры, а также фотоинициаторы и ингибиторы) являются крайне токсичными. Поэтому для применения биоимплантатов на основе метода ЛС требуется специальная очистка. Второй недостаток — ФПК не является биорезорбируемой структурой, то есть не растворяется со временем в организме. ЛС включает в себя три этапа: 1) создание базовой модели изготавливаемого образца в электронном формате; 2) разбиение модели образца на тонкие слои для расчета траектории движения лазерного луча по каждому сечению; 3) последовательное воспроизведение соответствующих сечений на поверхности жидкой ФПК сфокусированным лазерным лучом. Следует заметить, что ФПК практически полностью поглощает лазерное излучение. Последовательный переход от одного слоя к другому можно осуществлять двумя способами: движением платформы относительно источника излучения или смещением источника излучения. Первый способ предпочтительнее, так как в этом случае механическое влияние движущихся конструкций сводится к минимуму, что существенно снижает погрешность. В обоих случаях расстояние смещения выбирается равным глубине слоя (от 0,05 до 1 мм). Операция повторяется до завершения процесса изготовления, а количество циклов зависит от геометрических размеров изделия. Затем изделие подвергается финальной обработке, которая в зависимости от области применения изготавливаемого образца может включать следующие этапы: обработка мощной ультрафиолетовой лампой для достижения максимальной конверсии жидких мономеров в твердый полимер, промывка в ацетоне, сушка полученной детали и удаление технологических подпорок. Для удовлетворения требований тканевой инженерии структура образца должна

иметь пористый характер. Для формирования пористости удобно использовать сверхкритическую двуокись углерода. Двуокись углерода, обладая низкой вязкостью, высоким коэффициентом диффузии и высокой растворяющей способностью, позволяет реализовать экстракцию растворимых токсичных соединений из биоматериалов, полимеров, различных пористых структур. Образование пористой структуры можно достичь двумя способами: 1) удаление экстрагируемых веществ; 2) набухание полимера в результате его взаимодействия со сверхкритической двуокисью углерода. Следует заметить, что степень интеграции полученного образца зависит от неровностей рельефа и количества созданных пор, в которые врастает костная ткань. Применение сверхкритической двуокиси углерода заметно ускоряет процесс интеграции изготовленного имплантата. Современные достижения технологии позволяют использовать метод ЛС для челюстно-лицевой и стоматологической реконструкции, тканевой инженерии, а также в гинекологии и судебной медицине.

Второй лазерной технологией быстрого прототипирования служит технология селективного лазерного спекания (СЛС), основанная на формировании объекта из плавкого порошкового материала. Однако объемное поглощение и полный расплав полимерных частиц не позволяют использовать СЛС для спекания термически нестабильных систем — биорезорбируемых алифатических полиэфиров, представляющих наибольший интерес для имплантологии и тканевой инженерии. Развитием метода СЛС стал метод поверхностного селективного лазерного спекания (ПСЛС), предложенный Институтом проблем лазерных и информационных технологий РАН. В отличие от СЛС, метод ПСЛС основан на нагревании распределенных по поверхности полимерных частиц, сенсibilизаторов (частиц углерода). Такое распределение способствует равномерному распределению энергии излучения, а процесс спекания происходит без изменения биохимического состава частиц полимера, а также деструкции молекул полимера и присутствующих в нем биологически активных веществ. При использовании ПСЛС излучение поглощается только частицами сенсibilизатора, что значительно уменьшает зону перегрева. Подбирая частотные характеристики излучения и его интенсивность, можно управлять процессом спекания и сформировать трехмерную структуру за счет плавления только верхних слоев полимерных частиц, что позволяет избежать нежелательного перегрева внутренних слоев. Следует заметить, что толщина слоев порошка достигает 3 мм. Варьируя параметры излучения, можно менять режимы спекания, что приведет к различным термальным эффектам и различным степеням интеграции соответственно. Изготовленные матрицы будут иметь различную пористость и твердость, что значительно расширяет спектр применения данной технологии и позволяет повысить эффективность технологического процесса за счет формирования конкретных областей

применения изготавливаемого образца. Механические характеристики формируемых структур также зависят от геометрических параметров и структуры используемых полимерных частиц. Важным достижением является отсутствие токсичности полученных структур. Метод ПСЛС позволяет получать полимерные матрицы с биоактивными протеинами, что, в свою очередь, значительно увеличивает скорость интеграции. В качестве главных областей применения технологии ПСЛС можно выделить: челюстно-лицевую хирургию; нейрохирургию; хирургию позвоночника; ортопедию.

Представленные методы обладают высоким пространственным разрешением (0,1 мм). В настоящее время модифицированные методы ЛС и СЛС позволяют получать полимерные композитные биоактивные индивидуальные имплантаты [23].



Рис. 5. Индивидуальный дентальный эндопротез

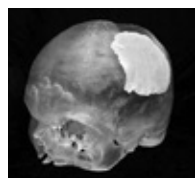


Рис. 6. Индивидуальный эндопротез черепа

Заключение

Лазеры пришли в биомедицину более сорока лет назад, но до сих пор продолжают активные поисковые научно-исследовательские работы с целью расширения областей их практического применения. Приведенный в данной статье обзор научной литературы показывает, что лазерная медицина по-прежнему является передовой и быстроразвивающейся областью науки и техники. Поэтому данное научное направление, безусловно, получит дальнейшее развитие, и нет сомнений, что в ближайшие годы мы станем свидетелями новых открытий в этой области.

Литература

1. Choy D.S. History of lasers in medicine. 1988.
2. Rosiak J., Peszynski-Drews C., Wysocki M., Jakubowska T. Lasers in medicine.
3. Peng Q., Juzeniene A., Chen J., O'Svaasand L., Warloe T., Giercksky K.E., Moan J. Laser in Medicine. 2008.
4. Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин Л.П. Лазерная диагностика в биологии и медицине. 1989.
5. Wilson B. C., Tuchin V. V., Tanev S. Advance in Biophotonics. 2004.
6. Samsøe E. Laser diode systems for photodynamic therapy and medical diagnostics. 2004.
7. Darveau S.A., Mueller J., Vaverka A., Barta C., Fitch A., Jurzenski J. A Modular Laser Apparatus for Polarimetry, Nephelometry, and Fluorimetry in General Chemistry. 2004.
8. Zysk A.M., Nguyen F.T., Oldenburg A.L., Marks D.L., Boppart S.A. Optical coherence tomography: a review of clinical development from bench to bedside. 2007.
9. Svorenova I., Strmen P., Olah Z. Optical coherence tomography — a new imaging method in ophthalmology. 2010.
10. Riley R.S. The flow cytometer: Historical developments and present applications. 1993.
11. Rily R. S., Idowu M. Principles and Applications of Flow Cytometry.
12. Серебряков В.А. Лазерные технологии в медицине. 2009.
13. Hecht J. Adaptive optics examines the eye. 2013.
14. Geng Y. Adaptive optics retinal imaging in the living mouse eye. 2012.
15. Hofer H., Singer B., Williams D. R. Different sensations from cones with the same photopigment. 2005.
16. Carroll J. Functional photoreceptor loss revealed with adaptive optics: An alternate cause of color blindness. 2004.
17. Polikov V.S., Tresco P.A., Reichert W.M. Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. 2005.
18. Moctezuma A., Tu J. An Overview of Cochlear Implant Systems. 2011.
19. Treleven P., Wells J. 3D Body Scanning and Healthcare Applications. 2008.
20. Global Cancer. 2008.
21. Rigotti C., Borghese N.A., Ferrari S., Baroni G., Ferrigno G. Portable and accurate 3D scanner for breast implants design and reconstructive plastic surgery.
22. Prinz F.B., Atwood C.L., Aubin R.F., Beaman J.J., Brown R.L., Fussell P.S., Lightman A.J., Sachs E., Weiss L.E., Wozny M.J. Rapid Prototyping in Europe and Japan. 1997.
23. Попов В.К., Евсеев А.В., Антонов Е.Н., Баграташвили В.Н., Коновалов А.Н., Панченко В.Я., Барри Дж.Дж., Уитакер М.Дж., Хоудл С.М. Лазерные технологии изготовления индивидуальных имплантатов и матриц для тканевой инженерии.

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

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

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

При проверке должна определяться эффективность работы фильтров очистки воздуха, скорость воздушного потока в рабочем проеме бокса...»

(СП 1.3.2322-08)

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

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

Состав проверок

Прежде всего, необходимо знать перечень того, что подлежит проверке в эксплуатируемых боксах. Руководствуясь ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической

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

В структуре предприятия есть участок приемо-сдаточных испытаний, оснащенный самыми современными приборами и оборудованием. Каждое готовое изделие проходит здесь всесторонний контроль качества в соответствии с требованиями российских и европейских стандартов. Методики проверки и тестирования постоянно совершенствуются. Инженеры предприятия регулярно обмениваются опытом с отечественными и зарубежными специалистами. На базе предприятия проводятся обучающие семинары для сервисных инженеров.

безопасности»**, можно констатировать, что содержание перечня проверок зависит от типа испытаний — на соответствие классу, после монтажа или при техническом обслуживании боксов. **Но независимо от типа испытаний, в каждом случае обязательно проверяются:**

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

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

Оборудование и приборы

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

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

Убедитесь в наличии этих приборов у сервисного инженера. К слову сказать, стоимость подобного осна-

** ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности» является аутентичным переводом европейского стандарта EN 12469:2000 «Biotechnology — Performance criteria for microbiological safety cabinets».

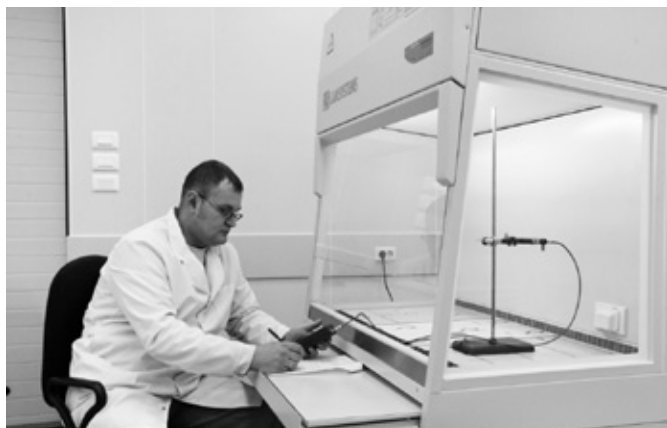


Рис. 1. Измерение скорости воздушного потока термоанемометром



Рис. 2. Проверка целостности HEPA фильтра счетчиком аэрозольных частиц

щения исчисляется сотнями тысяч рублей, и если у специалиста такое оборудование есть, значит, к вопросу сервисного обслуживания он подходит со всей ответственностью.

Согласно ГОСТ Р ЕН 12469-2010, «... Все оборудование, используемое для таких испытаний, должно быть сертифицировано и периодически откалибровано. Дата последней калибровки должна быть зафиксирована и легко доступна для визуализации». Поэтому не стесняйтесь попросить сервисного инженера показать вам ежегодно выдаваемые **свидетельства о поверке** на используемые приборы и оборудование. Обратите внимание, что выдача подобных сертификатов должна осуществляться органом, получившим государственную аккредитацию на осуществление этой деятельности.

Подтверждающие документы

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

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

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

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



Рис. 3. Визуализация движения потоков воздуха с помощью генерации дыма