

Серии научно-практических рецензируемых журналов



Медицинский АЛФАВИТ

28 (325) 2017



Modern
LABORATORY

MEDICAL ALPHABET
Russian Professional Medical Journal

Современная ЛАБОРАТОРИЯ

ТОМ № 4

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

Наш индекс в каталоге «РОСПЕЧАТЬ» 36228

www.medalfavit.ru



Витал Девелопмент Корпорэйшн

Наборы реагентов для иммуноферментного анализа ИМАКСИЗ (IMAXYZ)

Кат. №	Наименование набора	Чувствительность	Диапазон определения концентрации
BT12-09	Общий ПСА	0,1 нг/мл	0,1 – 40 нг/мл
BT12-10	Свободный ПСА	0,06 нг/мл	0,06 – 12 нг/мл
BT12-11	СА 125	1,6 Ед/мл	1,6 – 1000 Ед/мл
BT12-12	СА 19-9	0,5 Ед/мл	0,5 – 400 Ед/мл
BT12-13	СА 15-3	0,5 Ед/мл	0,5 – 270 Ед/мл
BT12-14	РЭА	0,25 нг/мл	0,25 – 100 нг/мл
BT13-15	ЛГ	0,2 мМЕ/мл	0,2 – 120 мМЕ/мл
BT13-16	ФСГ	0,2 мМЕ/мл	0,2 – 120 мМЕ/мл
BT13-17	Пролактин	20 мМЕ/мл	20 – 4600 мМЕ/мл
BT11-01	ТТГ	0,02 мкМЕ/мл	0,02 – 50 мкМЕ/мл
BT11-02	СТ4	1 пмоль/л	1 – 90 пмоль/л
BT12-24	IgE	1 МЕ/мл	1 – 1200 МЕ/мл



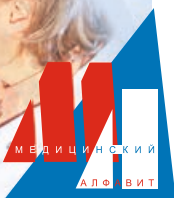
- Высокая аналитическая чувствительность при широком диапазоне определения аналитов
- Удобство использования
- Расширенная комплектация наборов
- Готовность к использованию всех реагентов
- Срок годности наборов — 18 месяцев
- Возможность использования на автоматическом ИФА-анализаторе IMAXYZ - 4



Тест-система Витал	Коэффициент корреляции
Общий ПСА	0,99
Свободный ПСА	0,97
СА 125	0,98
ЛГ	0,99
ФСГ	0,98
Пролактин	0,99
ТТГ	0,99
СТ4	0,98
Общий IgE	0,98

Высокая корреляция результатов измерения с ведущими производителями наборов реагентов для ИФА :

- Abbott Architect
- Roche Cobas
- Roche Modular.



Современная лаборатория Том №4

Медицинский алфавит

Серия журналов для специалистов

№ 28 (325) 2017

www.medalfavit.ru

Издатель: издательство медицинской

литературы ООО «Альфамед»

Тел.: (495) 616-48-00

E-mail: medalfavit@mail.ru

Учредитель и главный редактор

издательства Т.В. Синица

Почтовый адрес редакции:

129344, г. Москва, ул. Верхоянская, д. 18, к. 2

Тел.: (495) 616-48-00, 221-76-48

E-mail: medalfavit@mail.ru

Главный редактор серии журналов

«Медицинский алфавит»

А. С. Ермолов

Редакционный совет журнала

«Медицинский алфавит»

В.Г. Акимкин, д.м.н., проф.

А.Ж. Гильманов, д.м.н., проф.

Е.А. Евдокимов, д.м.н., проф.

А.С. Ермолов, д.м.н., проф.

А.А. Кулаков, д.м.н., проф.

Р.Г. Оганов, д.м.н., проф.

В.И. Покровский, д.м.н., проф.

С.А. Рабинович, д.м.н., проф.

В.Е. Синицын, д.м.н., проф.

С.К. Терновой, д.м.н., проф.

Н.В. Шестопалов, д.м.н., проф.

С.Н. Щербо, д.м.н., проф.

Председатель редакционного совета

журнала «Медицинский алфавит»

серии «Современная лаборатория»:

С. Н. Щербо

Руководитель отдела рекламы

и маркетинга: Т.Е. Чикмарева

medalfavit@bk.ru

Руководитель отдела продвижения,

распространения и выставочной

деятельности Б.Б. Будович

medalfavit_pr@bk.ru

Редакция оставляет за собой право

сокращения и стилистической правки

текста без дополнительных согласований

с авторами.

Мнение редакции может не совпадать

с точкой зрения авторов опубликованных

материалов.

Редакция не несет ответственности

за последствия, связанные с неправильным

использованием информации.

Журнал зарегистрирован Министерством РФ

по делам печати, теле-, радиовещания

и средств массовых коммуникаций.

Рег. номер ПИ № 77-11514 от 04.01.2002

Уст. тираж 12000. Формат А4.

Цена договорная.

Подписан в печать 4 октября 2017 года.

При перепечатке ссылка на журнал «МА»

обязательна. За содержание рекламы

ответственность несет рекламодатель.

За достоверность сведений, изложенных

в статьях, ответственность несет автор.

Содержание

- 5 **Медицина 5П: молекулярно-диагностические технологии мобильного здравоохранения**
С. Н. Щербо, Д. С. Щербо, М. Ю. Кралин
- 12 **Клинические перспективы исследования компонентов сигнальной системы VEGF в сыворотке крови больных раком почки**
Е. С. Герштейн, А. В. Колпаков, О. И. Вашкетова, С. Д. Безжанова, А. А. Морозов, Н. Е. Кушлинский
- 17 **Диагностика и иммунофенотипические особенности бластных клеток при острых миелоидных лейкозах: экспрессия пан-миелоидных и линейно-нерестриktированных антигенов**
Л. Ю. Гривцова, Н. Н. Купрышина, М. А. Френкель, О. А. Безнос, Н. Н. Тупицын, О. Ю. Баранова, П. А. Зейналова
- 23 **Биохимический анализ мочи с использованием тест-полосок. Анализ форменных элементов мочи**
- 24 **Персонализированная оценка особенностей митохондриальной ДНК**
А. С. Воронкова, А. А. Литвинова, В. С. Сухоруков
- 31 **Диагностика острого панкреатита с позиций доказательной медицины**
Л. А. Беганская, А. А. Кишкун
- 40 **Влияние физиологических и аналитических погрешностей на интерпретацию количественных результатов лабораторных исследований**
И. А. Волкова
- 46 **Актуальные аспекты подготовки тромбоцитов человека к использованию в регенеративной медицине**
М. С. Макаров
- 53 **Окислительная модификация белков и показатели антиоксидантной защиты при острой алкогольной интоксикации**
Н. А. Терехина, Е. В. Жидко, Г. А. Терехин, О. Г. Горячева
- 55 **Практика реализации требований ISO 15189:2012 (ГОСТ Р ИСО 15189–2015) по управлению субподрядными лабораториями. Часть 2**
А. В. Каленская, А. В. Эмануэль, Е. В. Аверьянова, Г. А. Иванов, Т. А. Окша, В. Н. Кустова
- 61 **Роль лабораторных исследований в системе эпидемиологического надзора за инфекциями**
С. Г. Марданлы
- 66 **Подписка**

Contents

- 5 **5P Medicine: molecular diagnostic technologies of mobile healthcare**
S. N. Shcherbo, D. S. Shcherbo, M. Yu. Kralin
- 12 **Clinical prospects of VEGF signaling system components investigation in blood serum of renal cancer patients**
E. S. Gershtein, A. V. Kolpakov, O. I. Vashketova, S. D. Bezhanova, N. E. Kushlinski
- 17 **Diagnosis and immunophenotypic features of blast cells in acute myeloid leukemia: pan-myeloid and linear-nonrestricted antigens**
L. Yu. Gritsova, N. N. Kupryshina, M. A. Frenkel, O. A. Beznos, O. Yu. Baranova, P. A. Zeynalova, N. N. Tupitsyn
- 24 **Personalized assessment of mitochondrial DNA features**
A. S. Voronkova, N. A. Litvinova, V. S. Sukhorukov
- 31 **Diagnosis of acute pancreatitis from standpoint of evidence-based medicine**
L. A. Beganskaya, A. A. Kishkun
- 40 **Influence of physiological and analytical errors in interpretation of quantitative laboratory results**
I. A. Volkova
- 46 **Actual aspects of human platelets preceeding treatments for use in regenerative medicine**
M. S. Makarov
- 53 **Oxidative modification of proteins and indicators of antioxidant protection in acute alcohol intoxication**
N. A. Teryokhina, E. V. Zhidko, G. A. Teryokhin, O. G. Goryacheva
- 55 **Practice of implementing requirements of ISO 15189:2012 (GOST R ISO 15189–2015) for subcontracting laboratories management. Part 2**
A. V. Kalenskaya, A. V. Emanuel, E. V. Averyanova, G. A. Ivanov, T. A. Oksha, V. N. Kustova
- 61 **Role of laboratory research in the system of epidemiological surveillance of infections**
S. G. Mardanly
- 66 **Subscription**



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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ НАШЕГО ИЗДАНИЯ!

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

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

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

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

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

Медицина 5П: молекулярно-диагностические технологии мобильного здравоохранения

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

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

М. Ю. Кралин, доцент кафедры косметологии и эстетической медицины²

¹ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва

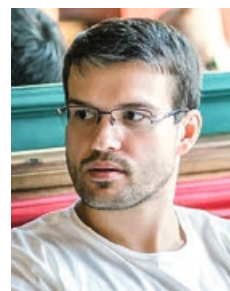
5P Medicine: molecular diagnostic technologies of mobile healthcare

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

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



С. Н. Щербо



Д. С. Щербо

Резюме

В обзоре рассмотрены технологии мобильного здравоохранения (mHealth) — новой, стремительно развивающейся области медицины. Чрезвычайно перспективными являются гибридные устройства на основе микрофлюидных технологий, мобильные приборы для мониторинга сахарного диабета, применение мобильных телефонов в иммуноанализе, микроскопия в диагностике онкологических заболеваний. Амплификационные технологии мобильного здравоохранения используются, в частности, в диагностике инфекционных и паразитарных заболеваний. Созданы все условия для возникновения массовой открытой онлайн-медицины (МООМ).

Ключевые слова: мобильное здравоохранение, микрофлюидные технологии, массовая открытая онлайн-медицина.

Summary

The review considers mobile health technologies (mHealth) — a new, rapidly developing field of medicine. Extremely promising are hybrid devices based on microfluidic technologies, mobile devices for monitoring diabetes mellitus, the use of mobile phones in immunoassay, microscopy in the diagnosis of cancer. Amplification technologies of mobile health care are used, in particular, in the diagnosis of infectious and parasitic diseases. All conditions for the emergence of mass open online medicine (IOM) have been created.

Key words: mobile health care, microfluidic technologies, mass open online medicine.

Мобильное здравоохранение (mHealth), активно используемое в прецизионной и персонализированной медицине и в целом медицине 5П [1], объединяет два параллельно развивающихся направления: технологии для лечения и ухода за больными и устройства для контроля здоровья человека. Среди основных катализаторов — смартфоны и интернет, который предоставил людям недоступную им ранее возможность обмениваться знаниями, уточнять диагноз и (или) искать эффективную терапию, не прибегая к помощи доктора. Возник спрос на медицинский контент и многочисленные сервисы, ориентированные на пациента (от электронной записки к врачу до дистанционной диагностики). Значение интернет-сообществ, объединяющих людей с одинаковыми проблемами со здоровьем (например,

PatientsLikeMe), трудно переоценить. В начале 2015 года Apple представила программную платформу ResearchKit, которая сможет снимать медицинские показания с миллионов владельцев iPhone и других мобильных устройств компании. С новым программным обеспечением Apple получает возможность принимать данные о здоровье пользователей, которые захотят поделиться ими с компанией, и передавать их медикам и ученым для использования в медицинских исследованиях. Платформе ResearchKit можно будет задать разрешения на использование микрофона, камеры, сенсорного экрана и акселерометра, с помощью которых можно проверять почерк, дрожание рук и голоса, темп и шаткость походки, уровень двигательной активности, измерять ритмы сердечный и дыхания и т. п. Приложение можно будет

настроить на работу с внешними устройствами некоторых производителей (весами, глюкометрами и др.), с помощью которых можно будет измерять вес, уровень глюкозы в крови и пиковую скорость выдоха. Создавая новую платформу, Apple заключила соглашения со многими известными медицинскими центрами, занимающимися исследованиями болезни Паркинсона, рака груди, заболеваний сердца и сосудов, сахарного диабета и астмы. Приложение будет не только собирать данные; в его задачи будет входить также предварительная постановка диагноза и оценка эффективности терапии людей, уже страдающих от того или иного заболевания. Важно и то, что распространяться ResearchKit будет как программное обеспечение с открытым исходным кодом (open source). То есть энтузиасты смогут его улучшать, а другие

пользователи получают возможность портировать его на свои платформы, превратив поток сбора медицинских данных для исследований в явление по-настоящему глобальное.

Уже тысячи занимающихся генетическими заболеваниями врачей и исследователей по всему миру используют для предварительной диагностики компьютерную программу Face2Gene. Программа Face2Gene определяет паттерн, общий для группы людей с одним синдромом. Установление этого общего знаменателя позволяет программе создавать составное характерно-усредненное изображение, соотносящееся с заболеванием. По оценке Face2Gene, из более чем 7 тысяч известных генетических синдромов до половины связаны с особым типом лица, который можно узнать и использовать для установления диагноза. Синдром Дауна, например, является одним из наиболее распространенных, и поэтому его легче диагностировать. Но более редкие заболевания могут оказаться сложной задачей. Face2Gene бесплатно использует данные, собранные генетиками. Мобильное приложение автоматически фотографирует пациента, загружает эту фотографию на сервер, а также анализирует черты лица в течение нескольких секунд, чтобы составить список синдромов, соответствующих идентифицированным сходствам. Каждый синдром сопровождается информацией из лондонских медицинских баз данных, в которых хранится и пополняется коллекция дисморфологических изображений. Пользователи могут наложить лицо своего пациента на лицо прототипа с заболеванием и кликнуть на тепловую карту, показывающую области лица, наиболее совпадающие с репрезентативным изображением конкретного синдрома. Они могут также отметить признаки, присутствующие у их пациента, производя тем самым пересчет списка потенциальных синдромов. В дальнейшем FDNA продолжат работу по определению черт лица, соотносящихся с различными заболеваниями, в частности, с аутизмом. Приложение предназначено для определения за-

болеваний преимущественно у детей. При регистрации оно запрашивает медицинскую специальность, квалификацию и название лечебного или научного учреждения. Для диагностирования генетических заболеваний пациента достаточно загрузить одно или несколько его фронтальных фото с помощью веб-приложений или приложений для Android или iOS. Каждый обработанный запрос может быть сохранен в базе программы, но о конфиденциальности беспокоиться не стоит: сохраняется не собственно лицо, а его деиндивидуализированная математическая модель (формализованный фенотип). По результатам сравнения загруженного фото с типами лиц, характерными для тех или иных генетических заболеваний, программа выдает список вероятных заболеваний пациента и показывает на шкале степень вероятности заболевания — от низкой до высокой.

Сегодня при наличии сыпи на коже можно сделать фото с помощью смартфона и загрузить его в приложение для обработки. Через несколько минут надежный компьютерный алгоритм, отличающийся большей точностью, чем большинство врачей, выдаст бы текст с диагнозом. Текст включал бы описание шагов, которые необходимо предпринять, возможно, местное лечение с помощью мази или рекомендацию сходить к дерматологу для получения очной консультации. Всеобъемлющая медицинская информация о человеке будет доступной, анализируемой и передаваемой: от полученных с помощью датчиков результатов УЗИ, лабораторных исследований до геномного секвенирования. Многие терабайты данных человека всю жизнь будут накапливаться в личном облачном хранилище. Сегодня каждый день генерируются три квинтиллиона байтов данных. Потребовалось 16 лет, чтобы каждый четвертый американец стал пользоваться персональным компьютером, 13 лет — мобильным телефоном, 7 лет — интернетом, а в случае смартфона хватило двух лет (есть у 2 из 7,25 млрд жителей Земли и обеспечивает контакт с 95 % населения планеты). Если печатный

станок Иоганна Гутенберга обеспечивал архивирование материалов, связанных с культурой, наукой и выдающимися людьми, мобильные телефоны архивируют огромные объемы частной информации. В 1450 году в Европе менее 8 % населения были грамотными, а с изобретением книгопечатания (пример массового производства) знания стали доступны простым людям, что привело к настоящей культурной, технологической и научной революции.

Основой мобильного здравоохранения, несомненно, могут стать устройства на основе интеграции диагностических приборов с мобильными телефонами. Количество мобильных телефонов в мире к 2016 году приблизилось к 8 млрд причем 55 % составляют смартфоны, которые могут обеспечить круглосуточный доступ к медицинской информации и легко справляются с функцией мониторинга здоровья своего владельца. Люди в среднем пользуются телефоном 5 часов в день и проверяют его примерно 85 раз в сутки. Четверть британских пользователей ни разу в неделю не эксплуатируют его в режиме телефона, а приложения служат не только для развлечения или коммуникации, но и для просвещения, мониторинга здоровья, в том числе и диагностики. Тех, кто ведет сидячий образ жизни, может заинтересовать приложение, автоматически посылающее напоминания о том, что время от времени надо встать и хоть немного размять мышцы, которые начинают приходить после того, как программа зафиксировала, что пользователь долго был неактивен. Участники из группы, пользующейся приложением, сократили время, проведенное сидя, на 3 % (25 минут в день). Одно из трех глобальных направлений в рамках цифровой медицины [1] — это все то, что связано с биосенсорами, датчиками и гаджетами, позволяющими человеку контролировать состояние своего организма. Специальное приложение на iPhone позволяет самому снимать кардиограмму. Медицина 5П будет иметь дело не с болезнями, а с конкретными людьми, что является очень важным идеологическим переломом:

анализ генома, работа с массивом информации или получение данных с датчиков в режиме 24 часа и 7 дней в неделю.

Гибридные системы на основе микрофлюидных платформ

В опубликованном недавно обзоре подробно рассмотрены гибридные системы на основе микрофлюидных (М) платформ и смартфонов (S) (MS²) для диагностики заболеваний [2]. Преимущества рассматриваемых приборов состоят в высокой скорости выполнения теста, низкой цене, мобильности и простоте в использовании, которые могут применяться в домашних условиях и небольших лабораториях. Микрофлюидные технологии в последнее время получили широкое развитие в различных областях науки, техники и медицины [3–6]. Сначала микрофлюидные приборы производили из силикона (1988), стекла (1992) и полиметилсилоксана (PDMS) (1998), затем и из термопластика [7] и чиповой бумаги (2007). Указанные материалы в микроканальцах под действием капиллярных сил обеспечивают движение растворов и реагентов. Микрофлюидные технологии оперируют микролитровыми объемами жидких реактивов и микрометровыми размерами каналов и реакторов [8]. MS²-технологии нашли свое применение в охране окружающей среды: нитраты, тяжелые металлы, детекция патогенов (*E. coli*, *Salmonella*) и, конечно, в биомедицинских исследованиях и рутинных диагностических тестах.

Некоторые подходы основаны на колориметрической детекции и иммунохроматографии. В одной из ранних работ в 2008 году исследователи из Гарвардского университета интегрировали смартфон с бумажным микрофлюидным чипом для измерения концентрации глюкозы и белков [9]. Две разработки были посвящены определению на тест-стрипах общего холестерина за 60 с колориметрическим (с 1,8 % точностью от 140 до 400 мг/дл) [10] и биохимилуминесцентным (от 20 мг/дл) [11] методами. Колориметрическим методом с точностью до 10 наномолей

измерялась концентрация 25-гидроксивитамина Д [12] с использованием метода иммуноанализа, основанного на наночастицах золота. Авторы подчеркивают, что данная работа это первый шаг к созданию NutriPhone для контроля за уровнем витаминов и важнейших компонентов питания. Представлена мобильная платформа NutriPhone для анализа в крови уровня витамина В₁₂ за 15 минут, включающая смартфон и конкурирующего типа стрип для количественного определения витамина В₁₂ ниже чем наномоль/л физиологического уровня, а для увеличения продолжительности конкурирующей реакции присоединения и использована амплификация сигнала серебром [13]. Показана эффективность NutriPhone для количественного определения витамина В₁₂ в физиологическом диапазоне, и проведено испытание метода на 12 образцов капиллярной крови (40 мкл) пациентов.

В 2009 году была создана дешевая портативная иммуоферментная система путем соединения преимуществ смартфона и прибора на основе PDMS-флюидомики [14]. В 2015 году последняя генерация смартфонов была использована для создания портативного количественного микрофлюидного прибора для биохимического анализа [15].

Мобильные устройства мониторинга сахарного диабета

Появились новые девайсы, созданные специально для диабетиков, у которых возникает множество неудобств с отслеживанием уровня глюкозы, поскольку традиционно необходимо анализировать кровь из пальца. Созданный клейкий накожный пластырь определяет и даже регулирует уровень сахара в крови, так как была обнаружена точная корреляция между уровнями глюкозы крови и пота. Пластырь включает в себя датчики, регистрирующие концентрацию глюкозы в поту, и систему микроигл, которые впрыскивают ЛС-метформин, если концентрация сахара высока. Разработчики после клинических испытаний собираются сделать свою технологию широко доступной. Компания

Google совместно с фармацевтической концерном Novartis в 2014 году анонсировала выпуск контактных линз со встроенным глюкометром. Линза со встроенным сенсором (выглядит как блески, а встроенная антенна тоньше человеческого волоса) постоянно измеряет уровень сахара в слезной жидкости пациента и раз в секунду передает информацию на смартфон или планшет. Беспроводной чип и миниатюрный датчик встроены между двумя слоями мягкого материала обычных контактных линз. Снятие показаний происходит с частотой раз в секунду. Предполагается вставить в конструкцию еще и миниатюрные светодиодные лампочки, которые будут загораться, когда концентрация глюкозы достигнет определенного значения. Лаборатория Google вместе со своим партнером — фармацевтической компанией Novartis — объявила о начале процесса лицензирования технологии в 2014 году.

Как правило, устройства носимой электроники и портативной диагностики применяются вместе с приложениями для смартфонов и веб-сервисами. В идеале задача разработчика — сделать так, чтобы данные, накапливаемые на облачном сервере, передавались в удобоваримой форме напрямую лечащему врачу. Такие интегрированные платформы имеются в том числе в России. Компании «НормаСахар», которая разработала онлайн-систему слежения за уровнем глюкозы в крови для диабетика, удалось технически соединить медицинские устройства, веб-сервис и врачей. Сегодня глюкометры «Диаконт» уже передают данные на платформу автоматически, причем участие пациента в этом процессе сводится к установке бесплатного софта и подключению глюкометра кабелем к компьютеру. Информация круглосуточно поступает штатному лечащему врачу, который может проконсультировать пациента или быстро связаться с ним, если результаты исследований превышают допустимую норму. В прошлом году компания «НормаСахар» представила инсулиновую помпу, которая управляется по протоколу Bluetooth

со смартфона с установленным приложением. Прибор проходит клинические испытания и в 2016 году, как ожидается, выйдет на массовый рынок.

Представлен основанный на смартфоне флуоресцентный детектор для mHealth, ключевыми элементами которого являются камера смартфона и капиллярный анализ, что увеличивает чувствительность на два порядка [16]. Капиллярный чип скомбинирован с LED-камерой для регистрации флуоресценции в диапазоне 450–740 нм и позволяет использовать образцы объемом менее 10 мкл [17]. Восьмиканальный МБ для детекции флуоресцентного сигнала создан комбинацией двух полимерных слоев, каждый канал которого рассчитан на два реагента (фермент и субстрат). Для применения в мобильной медицине прибор снабжен CCD-детектором и LED-мультиспектральным излучателем.

Применение мобильных телефонов в иммуноанализе

Регистрацию рассмотренных в прошлом разделе результатов ИХ-анализа могут осуществлять не только специализированные, но и обычные мобильные устройства и офисная техника [18]. Известны многочисленные примеры использования для указанных целей камер мобильных телефонов и смартфонов [19, 20], в том числе для детекции флуоресцентных меток [21].

Определение высокочувствительного С-реактивного белка [22] с пределом чувствительности $0,026 \pm 0,002$ мкг/мл. Реакция происходит в 96-луночной планке, которая после реакции ставится на белую бумагу и освещается стандартной настольной лампой под углом в 50 градусов. Телефон располагается на расстоянии 12 см от планки. Похожую разработку провели китайские исследователи по определению IgG с использованием микрофлюидного иммуноанализа с детекцией с применением наночастиц золота [23]. Созданы системы персонализированного определения аллергенов в продуктах питания [24] на базе платформы iTube, детекции *E. coli* [25] и неинвазивный

по моче иммуноанализ для диагностики рака простаты по биомаркеру PCADM-1 [26].

На основе смартфона создана мини-ИФА-лаборатория для определения в трехплексном варианте антител к вирусу ВИЧ, трепонема-специфических для диагностики сифилиса и нетрепонемных для выявления активной инфекции [27]. В слепом эксперименте тест (продолжительность 15 минут) конкурировал с золотым стандартом для выявления ВИЧ методом ELISE и скрининговым тестом на сифилис с чувствительностью 92 и 100 % и специфичностью 79 и 100 % соответственно. Создан быстрый тест [28], основанный на иммунохроматографическом анализе, который опробован на диагностике малярии, туберкулеза и ВИЧ для смартфона на базе платформ Android и iPhone. Разработан полуколичественный скрининговый [для концентраций более 5 mIU/L(–1), гипотиреодизм] метод определения тиреостимулирующего гормона (thyroid stimulating hormone, TSH) с использованием бокового иммунохроматографического анализа [29]. Наблюдая результаты, особенно в зоне низких концентраций [достигнута минимальная концентрация mIU/L(–1)] (гипертиреодизм), можно использовать возможности централизованной клинической лаборатории В дальнейшем система может быть модернизирована как РОСТ для количественного определения гормона в сыворотке с использованием смартфона.

Микроскопия в диагностике онкологических заболеваний

В Стэнфордском университете изобретен инновационный экономичный микроскоп «оригами», который собирается из плоского листа бумаги за 10 минут. Сворачиваемый микроскоп или фолдоскоп не требует внешнего источника энергии (необходима трехвольтовая батарейка), мало весит, все затраты на изготовление составляют менее одного доллара США, а увеличивает объект в 2 тысячи раз (350-кратное увеличение достаточно для обнаружения простейших и паразитов

в воде или образцах крови, а тысячекратное дает возможность наблюдать патогенные процессы) [30]. Имеется специальный флуоресцентный микроскоп, являющийся насадкой на смартфон, а реакция протекает в бумажном чипе [31].

Проанализировали образцы тканей 25 пациенток с раком шейки матки. Для контроля образцы исследовали традиционными гистологическими методами и разделили на категории в зависимости от тяжести заболевания (высокий риск, низкий риск, доброкачественная опухоль), и для двух методов — классического и нового — характеристики образцов совпали. При этом анализ с использованием новой системы для смартфона проходит очень быстро — на всю процедуру, включая приготовление образца и анализ данных, требуется 45 минут. Другое преимущество новой системы — это большой угол обзора. В одном зрительном поле камеры смартфона помещаются десятки тысяч клеток, и их можно проанализировать одновременно. При диагностике с помощью микроскопии можно одновременно изучать намного меньшие количества клеток. Голографическая оценка лимфотканной ткани (ГОЛТ) адаптирована для смартфона [32]: система детектирует малигнизировавшиеся клетки лимфомы с помощью маркерспецифических микрошариков, которые продуцируют уникальную голографическую картинку. Авторы оптимизировали ГОЛТ для детекции лимфом, причем анализ занимает менее 1,5 часа и показывает хорошее соответствие со стандартным цитологическим анализом. Создан портативный флуоресцентный микроскоп, представляющий насадку на Nokia Lumia 1020 для выявления мутаций, ассоциированных с некоторыми видами рака — мутации в гене KRAS (рак толстой кишки) в 1 фемтомоль ДНК, и на несколько процентов отличающийся от стационарных приборов [33].

Созданы специальные насадки, которые позволяют использовать смартфоны для микроскопии, диагностики глазных болезней, а так-

же для сверхбыстрой молекулярной диагностики. Смартфон нужно будет снабдить специальной насадкой, в которой есть отделение для образца и источник света, а также приложение, которое отправляет данные для анализа на сервер, а потом демонстрирует результаты молекулярного исследования пользователю. С помощью такого устройства можно будет проводить не только качественный, но и количественный молекулярный анализ. Была создана специализированная насадка на смартфон для диагностики серповидноклеточной болезни (и одноименной анемии, которая входит в эту группу патологий), встречающейся у четверти населения Центральной и Западной Африки [34]. Создан высокочувствительный метод анализа, для которого нужен очень маленький объем крови (менее 1 мкл) и, соответственно, требуется малое количество реактивов. Диагностика основана на том, что плотность серповидных эритроцитов при дезоксигенированных условиях выше плотности эритроцитов обычной формы. Легкий и компактный девайс, напечатанный на 3D-принтере и оснащенный светодиодом для освещения образца, оптической линзой для увеличения изображения и двумя магнитами, устанавливается на смартфон Samsung Galaxy S4. Магниты, обращенные друг к другу одноименными полюсами, образуют магнитное поле и обеспечивают магнитную левитацию красных кровяных телец. Забранный образец крови после несложных манипуляций загружают в микрокапиллярную трубку, которая вставлена между магнитами. Содержимое трубки подсвечивается светодиодом, и это изображение увеличивается с помощью асферической линзы. Встроенная в смартфон камера фотографирует образец, и полученное изображение обрабатывается за одну секунду специальным приложением для Android на том же самом смартфоне. К девайсу на смартфоне через специальный разъем подсоединяется и световой микроскоп. Из-за различий в плотности при левитации в магнитном поле серповидные эритроциты легко отличить от нормальных.

Амплификационные технологии мобильного здравоохранения

Чтобы проверить, есть ли в образце определенная ДНК (например, ДНК вируса), нужно использовать два типа шариков с приделанными одноцепочечными фрагментами ДНК, комплементарными целевой последовательности. Сначала целевая ДНК вылавливается из образца с помощью шариков одного типа. Затем к ним добавляются шарики другого типа. Если в образце были молекулы с концами, соответствующими последовательностям на двух разных шариках, то на выходе мы получим димеры шариков, соединенные молекулами пойманной ДНК. Такие димеры образуют характерную дифракционную картину, и если мы ее видим, значит, в образце есть целевая ДНК. Этим методом удалось детектировать атомоли (10^{-18} моля) целевой ДНК, и это без ПЦР-амплификации. Такая чувствительность сопоставима с чувствительностью самых точных методов исследования ДНК (теоретически с помощью ПЦР можно обнаружить единственную копию ДНК в пробе, на практике чувствительность метода на один или два порядка ниже — то есть 10^{-22} – 10^{-21} молей ДНК).

Среди разработок для биомедицинских исследований отметим работы, связанные с применением амплификационных технологий: ПЦР- и PDMS-чип для диагностики саркомы Капоши и LAMP на полимерном чипе для детекции *E. coli* [35], а авторам другой работы удалось количественно определить данный патоген за 15 минут по флуоресцентному сигналу через микроскоп на смартфоне [36]. ПЦР проводится в режиме трех различных температур (15 минут, 30 циклов), а детекция по конечной точке и сохраняется в флуоресцентном микроскопе. Прибор протестирован на определение 16S рРНК гена гипервариабельного V3 региона ДНК *E. coli*.

С помощью прибора для сверхбыстрой (94 с, 35 циклов) ПЦР PB на основе полимеразы *Thermococcus kodakaraensis* продемонстрирована амплификация фрагмента в 85 п. н. гена Shiga токсина *E. coli* O157:

H7 [37]. Предложен уникальный вариант количественного ПЦР, который проводится от энергии солнечной батареи на микрофлюидном чипе. Образец транспортируется через три различные температурные зоны. Создана платформа для проведения изотермальной реакции амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP). Время, необходимое для детекции *E. coli*, — всего 8,6 минуты при чувствительности 13 копий патогена в реакции. Немодифицированная камера телефона была использована для детекции результатов цифровой изотермальной РНК- и ДНК-амплификации в нанолитровом диапазоне [38]. Цифровая количественная и ультрачувствительная технология может быть, по мнению авторов, использована для диагностики вирусов ВИЧ и гепатита С. Серийный мобильный телефон [39] использован для детекции малярии: удалось достигнуть чувствительности 20,6 паразита на микролитр в крови, что в три раза выше по сравнению с коммерческой системой. Комбинация мобильного телефона с глобальной БД изображений, например REDcap, значительно расширяет возможности интерпретации результатов.

На базе беспилотного дрона создана мобильная система идентификации НК с использованием смартфона [40]. Данная технология использует возможность изотермического выполнения ПЦР с помощью одного нагревателя, позволяет применять стандартные пятивольтовые USB-источники, которые питают мобильные устройства (при работе от обычной или солнечной батареи). Определение флуоресценции с временным разрешением и количественная оценка достигаются с помощью камеры для смартфонов и встроенного приложения для анализа изображений. Стандартная подготовка образцов обеспечивается с помощью моторов беспилотных летательных аппаратов в виде центрифуг. Технология дает возможность построить полную систему анализа ДНК / РНК по цене 50 долларов США. В полевых условиях продемонстрирована возможность успешной амплификации

золотистого стафилококка и ДНК-мишеней фага в течение менее 20 минут. Возможность проводить быстрые анализы в полете с подключением смартфона исключает задержки между сбором проб и анализом, так что результаты испытаний могут быть доставлены за считанные минуты, что предлагает новые возможности для систем на основе дронов.

Диагностика инфекционных и паразитарных заболеваний

Происходит переход на недорогие портативные устройства для диагностики малярии [41, 42]. Малярийные паразиты при переваривании гемоглобина производят железосодержащие кристаллы гемозоина, которые можно распознать через нанопузырьки, лопающиеся, когда зараженные клетки подвергаются воздействию лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона [43]. Указанный метод анализа кожи дает мгновенные результаты, не требует реактивов и взятия пробы крови, при этом высокочувствителен: можно определить за 20 с одну инфицированную клетку из 800 красных кровяных телец без ложноположительных результатов.

Представлена компактная мобильная платформа с электрохимической детекцией для быстрых количественных биомедицинских исследований [44]. Графическая пошаговая инструкция на дисплее позволяет оператору легко провести анализ. Валидация прибора проведена на примере детекции богатого гистидином белка 2 (histidine-rich protein 2) *Plasmodium falciparum* — биомакера малярии с нижним пределом детекции 16 нг/мл в сыворотке крови человека за 15 минут. В другой работе [45] определение проводили в 10-процентной цельной крови, смешивая ее с конъюгатом антител к указанному белку с микрошариками. Белая LED-вспышка и цифровая камера смартфона использовались для детекции света в оптофлюидных каналах, которые находились по углом в 45 градусов к улавливающему сканеру. Достигнутый предел детекции реакции иммуноагглютинации микрошариков составил 1

пикограмм/мл (линейная область от 1 до 10 нанограмм/мл), а время анализа около 10 минут.

Мобильный телефон можно превратить в мощный микроскоп с помощью присоединяемого устройства, который способен распознать зараженные малярией красные кровяные тельца, используя простую световую микроскопию, а также диагностировать туберкулез с использованием флуоресцентной микроскопии [46]. Специалисты фирмы Caltech устранили необходимость в специальном источнике света для микроскопа на базе смартфона [47].

Разработан метод выявления гельминтов с применением микроскопии и мобильного телефона [48]. L. Loa — стратегия «тест и (не) лечение» применима для высокого уровня содержания *L. loa microfilariae* (более 30 000 на мл). Предложен мобильный совместимый с телефоном микроскоп, автоматически определяющий количество *L. loa microfilariae* в образце цельной крови прямо в маленьких стеклянных капиллярах, не требующий специальной пробоподготовки и окрашивания. Указанный point-of-care — прибор позволяет определить инфекционный агент за 2 минуты. Для валидации метода протестированы 33 подозреваемых на инфицирование Loa пациентов в Камеруне, и сделано заключение, что автоматический подсчет коррелирует с ручным (94 % специфичность; 100 % чувствительность).

Микрофлюидные устройства (лаборатория на чипе) или миниатюрные общепаналитические системы μ TAS [49] весьма успешно применяются для ускоренной диагностики инфекционных болезней, например, вируса герпеса с помощью смартфона. Дешевый фотодетектор для оптического считывания использовался в Руанде для диагностики ВИЧ у 70 пациентов за 20 минут (была зафиксирована только одна ошибка), а чувствительность сравнима с ИФА.

Предложено использование ПЦР в портативных мобильных устройствах типа «Генный радар» компании Nanobiosym, QuantuMDx, Biomepe для диагностики гонореи, ИППП, вируса Западного Нила, туберкулеза. Капля

крови или слюны помещается на наночип, который вставляется в планшет «Генный радар» компании Nanobiosym, и устройство диагностирует инфекцию за несколько минут [50]. Колориметрический тест на туберкулез, малярию и ВИЧ, выполняемый с использованием тестовой полоски и камеры смартфона (Кембриджский университет) [51]. Амплификационная технология Xpert для определения туберкулеза и антибиотикорезистентных к рифампину прошла испытания на 1 500 образцах [52].

Человечество стоит в самом начале новой медицинской коммуникационной революции. Смартфоны являются хранилищем огромного количества частной информации: СМС-сообщений, электронных писем, фотографий, видеозаписей. Существуют миллионы приложений, которые были специально разработаны для смартфонов и планшетов. Практика, когда данные вначале идут к врачам, а потом спускаются к пациентам, начинает принципиально меняться. Смартфоны станут каналом передачи данных: записей врача; показаний биодатчиков; результатов лабораторных исследований, УЗИ, компьютерной томографии, генетических исследований; данных по влиянию окружающей среды. Смартфоны легко подсоединяются к облачному хранилищу данных и все больше будут связываться с ресурсами суперкомпьютера. Реализуются образовательные инициативы ВОЗ в развивающихся странах через СМС, посвященные туберкулезу, малярии, ИППП и проблемам репродуктивного здоровья. Проанализированы тестовые сообщения мобильных телефонов по психическому здоровью и показано, что существуют четыре способа использования тестовых сообщений: напоминания (14 %), информация (17 %), вспомогательные сообщения (42 %) и процедуры самоконтроля (42 %) [53]. В дальнейшем предполагается, что смартфоны будут дешевыми, программное обеспечение бесплатным, а себестоимость медицинских устройств — низкой (например, датчики для ЭКГ стоимостью 50 центов). Таким образом, созданы все условия для возникновения массовой открытой онлайн-медицины (МООМ).

Список литературы

- Щербо С.Н., Щербо Д.С. Медицина 5П: Прецизионная медицина. // Медицинский алфавит. Современная лаборатория.— 2015.— 4.— С. 5–10.
- Yang Ke., Peretz-Soroka H., Liu Y et al. Novel developments in mobile sensing based on the integration microfluidic devices and smartphones. // *Lab on a chip*.— 2016.— DOI: 10.1039/c51c01524c.
- Hu J., Wang S., Wang L. et al. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. // *Biosens. Bioelectron.*— 2014.— 54.— P. 585–597.
- Martinez A.W., Phillips S.T., Carrilho E. et al. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. // *Anal. Chem.*— 2008.— 80.— P. 3699–3707.
- Lopez-Ruiz N., Curto V.F., Erenas M.M. et al. *Annal. Chem.*— 2014.— 86.— P. 9554–9562.
- Lu Y., Shi W., Qin J. et al. Low cost, portable detection of gold nanoparticle-labeled microfluidic immunoassay with camera cell phone. // *Electrophoresis*.— 2009.— 30.— P. 579–582.
- Berthier E., Young E.W.K., Beebe D. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. // *Lab Chip*.— 2012.— 12.— P. 1224–1237.
- Wu J.D., Wu X. Lin F. Recent developments in microfluidics-based chemotaxis studies. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. // *Lab Chip*.— 2013.— 13.— P. 2484–2499.
- Martinez A.W., Phillips S.T., Carrilho E. et al. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. // *Anal. Chem.*— 2008.— 80.— P. 3699–3707.
- Oncescu V., Mancuso M., Erickson D. Cholesterol testing on a smartphone. // *Lab Chip*.— 2014.— 14.— P. 759–763.
- Roda A., Michelin E., Cevenini L. et al. Integrating bioluminescence detection on smartphones: mobile chemistry platform for point-of-need analysis. *Anal. Chem.*— 2014.— 86.— P. 7299–7304.
- Lee S., Oncescu V., Mancuso M. et al. A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels. *Lab Chip*.— 2014.— 14.— P. 1437–1442.
- Lee S., O Dell D., Hohenstein J. et al. NutriPhone: a mobile platform for low-cost point-of-care quantification of vitamin B12 concentrations. // *Sci. Rep.*— 2016.— 6: 28237. doi: 10.1038/srep28237.
- Lu Y., Shi W., Qin J. et al. Low cost, portable detection of gold nanoparticle-labeled microfluidic immunoassay with camera cell phone. // *Electrophoresis*.— 2009.— 30.— P. 579–582.
- Lopez-Ruiz N., Curto V.F., Erenas M.M. et al. *Annal. Chem.*— 2014.— 86.— P. 9554–9562.
- Balsam J., Bruck H.A., Rasooly A. Smartphone-based fluorescence detector for mHealth. // *Methods Mol. Biol.*— 2015.— 1256.— P. 231–245.
- Balsam J., Bruck H.A., Rasooly A. Two-layer Lab-on-a-chip (LOC) with passive capillary valves for mHealth medical diagnostics. // *Methods Mol. Biol.*— 2015.— 1256.— P. 247–258.
- Rasooly A., Herold K.E. *Mobile Health Technologies. Methods and Protocols*. New York: Springer, 2015.
- Coshun A.F., Wong J., Khodadadi D. et al. A personalized food allergen testing platform on a cellphone. // *Lab. Chip*.— 2013.— 13.— 4.— P. 636–640.
- Olasagasti F., de Gordo J.C. Miniaturized technology for protein and nucleic acid point-of-care testing. // *Transl. Res.*— 2012.— 160.— 5.— P. 332–345.
- Rajendran V., Bakthavathsalam P., Ali B. J. Smartphone based bacterial detection using biofunctionalized fluorescent nanoparticles. // *Microchim. Acta*.— 2014.— 181.— 15–16.— P. 1815–1821.
- McGeough C. M., O Driscoll S. Camera phone-based quantitative analysis of C-reactive protein ELISA. // *IEEE Trans Biomed Circ Sys*. doi: 10.1109/TBCAS.2012.2234122.
- Lu Y., Shi S., Qin J. et al. Low cost, portable detection of gold nanoparticle-labeled microfluidic immunoassay with camera cell phone. // *Electrophoresis*.— 2009.— 30.— P. 579–582.
- Coshun A.F., Wong J., Khodadadi D. et al. A personalized food allergen testing platform on a cellphone. // *Lab Chip*.— 2013.— 13.— P. 636–640.
- Zhu H., Sikora U., Ozcan A. Quantum dot enabled detection of *Escherichia coli* using a cellphone. // *Analyst*.— 2012.— 137: 2541–2544.
- Kalorama Information Report. *The World Market Immunoassays*. United States, New York, 2013.
- Laksanasopin T., Guo T.W., Nayak S. et al. A smartphone dangle for diagnosis of infectious diseases at the point of care. *Sci. Transl. Med.*— 2015.— 7.— 273 re1.
- Mudanayali O., Dimitrov S., Sikora U. et al. Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone. *Lab. Chip*.— 2012.— 12.— P. 2678–2686.
- You D.J., Park T.S., Yoon J.Y. Cell-phone-based measurement of TSH using Mie scatter optimized lateral flow assays. *Biosens. Bioelectron.*— 2013.— 40.— P. 180–185.
- Miller G. How to make a microscope out of paper in 10 minutes. // *Wired*, March 7, 2014.
- Fronczek C.F., Park T.S., Harshman D.K. et al. *RSC Adv.*— 2014.— 4.— P. 11103–11110.
- Pathania D., Im H., Kilcoyne A. et al. Holographic Assessment of Lymphoma Tissue (HALT) for Global Oncology Field Applications. // *Theranostics*.— 2016.— 6.— 10.— 1603–1610.
- Kuhnemund M., Wei Q., Darai E. et al. Target DNA sequencing and in situ mutation analysis using mobile phone microscopy. // *Nature Comm.*— 2017.— 8.— 13913.
- Savage N. Bioinformatics: Big data versus the big C. // *Nature*.— 2014.— 509.— P. S66–S67.
- Stedtfeld R.D., Tourlousse D.M., Seyrig G. et al. Gene-Z: a device for point of care genetic testing using a smartphone. *Lab Chip*.— 2012.— 12.— P. 1454–1462.
- Angus S.V., Cho S., Harshman D.K. et al. A portable, shock-proof, surface-heated droplet PCR system for *Escherichia coli* detection. *Biosens. Bioelectron.*— 2015.— 74.— P. 360–368.
- Maltezos G., Johnston M., Taganov K. et al. Exploring the limits of ultrafast polymerase chain reaction using liquid for thermal heat exchange: A proof of principle. *Appl. Phys. Lett.*— 2010.— 97.— 264101.
- Rodriguez-Manzano J., Karymov M.A., Begolo S. et al. Reading Out Single-Molecule Digital RNA and DNA Isothermal Amplification in Nanoliter Volumes with Unmodified Camera Phones. // *ACS Nano*.— 2016.— 10.— 3.— P. 3102–3113.
- Scherr T.F., Gupta S., Wright D.W. et al. Mobile phone imaging and cloud-based analysis for standardized malaria detection and reporting. // *Sci. Rep.*— 2016.— 6: 28645. doi: 10.1038/srep28645.
- Priye A., Wong S., Bi Y. et al. Lab-on-a-Drone: Toward Pinpoint Deployment of Smartphone-Enabled Nucleic Acid-Based Diagnostics for Mobile Health Care. // *Anal. Chem.*— 2016.— 88.— 9.— P. 4651–4660.
- Wesolowski A., Eagle N., Tatem A.J. et al. Quantifying the impact of human mobility on malaria. // *Science*.— 2012.— 267.— P. 267–270.
- Lukianova-Hleb E.Y., Campell K.M., Constantinou P.E., et al. Hemozoin-generated vapor nanobubbles for transdermal reagent- and needle-free detection of malaria. // *PNAS Early Edition*, December 30, 2013.
- Lillehoj P.B., Huang M.C., Truong N. et al. Rapid electrochemical detection on a mobile phone. *Lab Chip*.— 2013.— 13.— P. 2950–2955.
- Stemple C.C., Angus S.V., Park T.S. et al. Smartphone-based optofluidic lab-on-a-chip for detecting pathogens from blood. *J. Lab. Autom.*— 2014.— 19.— P. 35–41.
- Breslauer D.N., Maamari R.N., Switz N.A. et al. Mobile Phone Based Clinical Microscopy for Global Health Application. // *PLoS One*.— 2009.— 4.— 7.— e6320.
- Lee S.A., Yang S. A smartphone-based chip-scale microscope using ambient illumination. // *Lab Chip*.— 2014.— 14.— P. 3056–3063.
- D'Ambrosio M.C., Bakalar M., Bennuru S. et al. Point-of-care quantification of blood-borne filarial parasites with a mobile phone microscope. // *Sci. Transl. Med.*— 2015.— 7.— P. 286 re4.
- Sackmann E.K., Fulton A.L., Beebe D.J. The Present and Future Role of Microfluidics in Biomedical Research. // *Nature*.— 2014.— 507.— P. 181–189.
- Farrell M. Blood tests in minutes, not days or weeks. // *Boston Globe*, September 29, 2013.
- Yetisen A.K., Martinez-Hurtado J.L., Carcio-Melendrez A. et al. A smartphone algorithm with inter-phone repeatability for the analysis of colorimetric tests. // *Sensors and actuators B: chemical*.— 2014.— 196.— P. 156–160.
- Theron G. et al. Feasibility, accuracy and clinical effect of point-of-care Xpert MTB/RIF Testing for tuberculosis in primary-care settings in Africa: a multicentre, randomized, controlled trial. // *The Lancet*.— 2014.— 383.— P. 424–435.
- Berrouiduet S., Baca-Garcia E., Brandt S. et al. Fundamentals for Future Mobile-Health (mHealth): A Systematic Review of Mobile Phone and Web-Based Text Messaging in Mental Health. // *J. Med. Internet Res.*— 2016.— 18.— 6.— e. 135.



Клинические перспективы исследования компонентов сигнальной системы VEGF в сыворотке крови больных раком почки



Н. Е. Кушлинский

Е. С. Герштейн, д.б.н., проф., вед. научный сотрудник лаборатории клинической биохимии¹

А. В. Колпаков, соискатель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики²

О. И. Вашкетова, к.м.н., с.н.с. лаборатории клинической биохимии¹

С. Д. Бежанова, аспирант отдела патологической анатомии опухолей человека¹

А. А. Морозов, соискатель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики²

Н. Е. Кушлинский, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, руководитель лаборатории клинической биохимии¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва

²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Минздрава России, г. Москва

Clinical prospects of VEGF signaling system components investigation in blood serum of renal cancer patients

E. S. Gershtein, A. V. Kolpakov, O. I. Vashketova, S. D. Bezhanova, N. E. Kushlinskiy

National Medical Research Centre of Oncology n.a. N. N. Blokhin, Moscow State Medical and Stomatological University n.a. A. I. Evdokimov; Moscow, Russia

Резюме

Успехи в лечении рака почки связаны с использованием антиангиогенных препаратов, поэтому изучение и поиск новых молекулярных маркеров, характеризующих его ангиогенную активность, не теряют актуальности. Цель исследования: сравнительная оценка содержания VEGF, VEGFR 1 и VEGFR 2 в сыворотке крови практически здоровых людей, больных раком и доброкачественными опухолями почки, анализ их взаимосвязи с основными клинико-морфологическими особенностями новообразований. Обследованы 99 больных раком и 10 больных доброкачественными опухолями почки. В контрольную группу вошли 80 человек. Концентрацию исследуемых белков определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа Quantikine® (R&D Systems, США). Содержание VEGF, VEGFR 1 and VEGFR 2 в сыворотке крови больных раком почки достоверно выше, чем в контроле. Уровень VEGF также повышен у больных доброкачественными опухолями. При пороговом уровне VEGF, равном 365 пг/мл, диагностическая чувствительность выявления первичного рака почки составляет 67%, специфичность — 70%. Только уровень VEGFR 1 положительно коррелирует со стадией заболевания и индексами T и N. Взаимосвязи уровня маркеров с гистологическим строением и степенью дифференцировки рака почки не выявлено. Таким образом, VEGF и его рецепторы имеют ограниченное диагностическое значение при раке почки, но могут быть использованы для мониторинга и предсказания эффективности антиангиогенной терапии.

Ключевые слова: рак почки, VEGF, VEGFR 1, VEGFR 2, сыворотка крови, диагностические характеристики.

Summary

Achievements in the treatment of renal cancer are associated with antiangiogenic therapy. Therefore, exploration of molecular markers characterizing its angiogenic activity are on the agenda. Objective of the study: comparative evaluation of VEGF, VEGFR 1 and VEGFR 2 content in blood serum of healthy persons, renal cancer and benign tumor patients, analysis of associations with the main clinical and pathologic features. 99 cancer and 10 benign renal tumor patients comprised the study group. Control group involved 80 persons. Concentration of the proteins studied was measured with direct ELISA kits (Quantikine®, R&D Systems, USA). VEGF, VEGFR 1 and VEGFR 2 levels in the sera of renal cancer patients were significantly higher than in control group. Serum VEGF was also higher in renal cancer patients than in those with benign tumors. At 365 pg/ml cut-off level VEGF diagnostic sensitivity for primary renal cancer comprised 67%, with specificity 70%. Only serum VEGFR 1 level was positively associated with clinical stage, T and N indices. No associations with tumor histological type or differentiation grade were found. Conclusion: VEGF and its receptors' levels in blood serum have limited diagnostic value in renal cancer, but might be regarded as promising markers for monitoring of antiangiogenic therapy results and prediction of its efficiency.

Key words: renal cancer, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGFR 1, VEGFR 2, blood serum, diagnostic characteristics.

Рак почки занимает третье место среди опухолей мочеполовой системы и составляет около 3 % всех злокачественных новообразований взрослого населения в России и во всем мире. Долгое практически

бессимптомное течение является причиной поздней диагностики рака почки: около 40 % пациентов на момент постановки диагноза имеют либо большую первичную опухоль, либо отдаленные метастазы. К сожалению,

после хирургического лечения метастазы развиваются и у примерно 30 % больных локализованным почечно-клеточным раком, а возможности адъювантного терапевтического лечения опухолей почки до недавнего

времени были ограничены их низкой чувствительностью к стандартной химио- и лучевой терапии.

Успехи в лечении рака почки, в первую очередь его наиболее распространенного светлоклеточного варианта, достигнутые в последние годы, связаны с использованием антиангиогенных препаратов, ингибирующих активность тирозинкиназных рецепторов факторов роста, вовлеченных в процесс ангиогенеза [1–3]. Теоретической предпосылкой для применения этих препаратов у больных светлоклеточным раком почки стал тот факт, что ключевую роль в этиологии данного заболевания играет инактивирующая мутация в гене опухоли-супрессорного белка VHL, тесно связанного с гипоксическим фактором HIF-1 α и индукцией ангиогенеза [4]. Однако, несмотря на значительные успехи антиангиогенной терапии рака почки, многие вопросы, связанные с диагностикой, прогнозом и предсказанием ее эффективности, до сих пор не решены [5–8]. В этой связи изучение и поиск новых молекулярных маркеров рака почки, в первую очередь показателей, связанных с его ангиогенной активностью, по-прежнему актуальны.

В регуляции ангиогенеза участвуют многие известные факторы роста и цитокины, такие как основные и кислые факторы роста фибробластов, эпидермальный фактор роста, α - и β -трансформирующие факторы роста, тромбоцитарный фактор роста эндотелиальных клеток тимидинфосфорилаза, фактор некроза опухолей, интерлейкины и др. Однако важнейшим положительным регулятором ангиогенеза, бесспорно, является фак-

тор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF). Экспериментальные исследования показали, что VEGF является индуктором роста клеток эндотелия, увеличивает проницаемость сосудов и, по-видимому, участвует в поддержании выживаемости эндотелиальных клеток *in vivo* и *in vitro*. Биологические эффекты VEGF опосредованы специфическими мембранными рецепторами, принадлежащими к классу рецепторных тирозинкиназ. В регуляции опухолевого ангиогенеза принимают участие два типа рецепторов VEGF — VEGFR 1/Flt-1 и VEGFR 2/Flk-1/KDR, биологическая роль которых, по-видимому, различна: VEGFR 1 индуцирует протеазную активность в эндотелиальных клетках и стимулирует миграцию в опухолевую ткань макрофагов, а VEGFR 2 вызывает дифференцировку, пролиферацию и миграцию клеток эндотелия сосудов. Ряд фактов указывают на то, что VEGF не только обладает проангиогенной активностью, но может и непосредственно участвовать в ауто- и паракринной регуляции пролиферации опухолевых клеток, воздействуя на находящиеся на их мембранах соответствующие рецепторы [9, 10].

Результаты целого ряда клинико-лабораторных исследований свидетельствуют о роли VEGF в развитии рака почки и неблагоприятном прогностическом значении высокой тканевой экспрессии этого белка [8, 11–13]. Роль и происхождение растворимых форм рецепторов VEGF, которые циркулируют в периферической крови как в норме, так и при различных патологических состояниях, до конца не ясны. Возможно,

эти молекулы являются природными антагонистами VEGF и противодействуют его ангиогенной активности. В целом данные литературы о клиническом значении уровня VEGF и его рецепторов в физиологических жидкостях и тканях больных раком почки остаются противоречивыми [14–18].

Цель данного исследования: сравнительная оценка содержания VEGF, VEGFR 1 и VEGFR 2 в сыворотке крови практически здоровых людей, больных раком и доброкачественными опухолями почки, анализ их взаимосвязи с основными клинико-морфологическими особенностями рака почки.

Материал и методы

Обследованы 99 больных раком (58 мужчин и 41 женщина; возраст — 29–81 год, медиана — 59 лет) и 10 больных доброкачественными опухолями почки (3 мужчин и 7 женщин; возраст — 42–84 года; медиана — 60 лет). 94 больных раком почки обследованы при первичном поступлении и пять на фоне прогрессирования заболевания. Диагноз рака почки подтвержден результатами планового гистологического исследования и последующего пересмотра препаратов. Первая стадия заболевания была у 53, вторая — у 10, третья — у 15 и четвертая — у 16 больных. В контрольную группу вошли 27 практически здоровых мужчин и 53 женщины в возрасте от 19 до 77 лет, медиана — 42 года. Исследование проведено согласно требованиям комиссии по этике Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н. Н. Блохина Минздрава России.

Таблица 1
Содержание VEGF, VEGFR 1 и VEGFR 2 в сыворотке крови больных опухолями почки и группы контроля

Обследованные группы	N	VEGF, пг/мл	VEGFR 1, пг/мл	VEGFR 2, нг/мл
Больные первичным раком почки (группа 1)	94	510 285–857	104 80,5–131,0	13,4 9,0–16,9
Больные раком почки на фоне прогрессирования (группа 2)	5	524 430–562	131 111–138	12,2 12,1–13,0
Больные доброкачественными опухолями почки (группа 3)	10	474 355–573	96,2 70,2–120,0	12,4 8,4–16,2
Контроль (К)	80	272 179–423	83,0 54,1–112,0	10,6 8,3–13,6
P		p1-K < 0,00001 p3-K < 0,05	p1-K < 0,01 p2-K < 0,05	p1-K < 0,01

Таблица 2
Чувствительность и специфичность VEGF в качестве серологического маркера новообразований почки

Обследованные группы	Чувствительность		
	VEGF > 644 пг/мл (90%)	VEGF > 423 пг/мл (75%)	VEGF > 365 пг/мл (95% ДИ)
Больные первичным раком почки	41%	62%	67%
Больные доброкачественными опухолями почки	20%	60%	70%
Специфичность			
Рак — здоровые 90%		80%	70%

Концентрацию исследуемых белков в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа Human VEGF Immunoassay, Human VEGFR 1 Immunoassay, Human VEGFR 2 Immunoassay (Quantikine®, R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителя.

У 24 больных раком почки также определили содержание VEGF в опухоли и гистологически неизменной ткани почки. Для проведения иммуноферментного анализа образцы тканей лизировали как описано ранее [17, 19].

Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия).

Полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 7.0. При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса, тест корреляции рангов Спирмена. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Во всех таблицах представлены показатели медианы, верхнего и нижнего квартилей.

Результаты и обсуждение

Содержание всех исследованных маркеров (VEGF, VEGFR 1 и VEGFR 2) в сыворотке крови первичных больных раком почки было достоверно повышено по сравнению с контролем (табл. 1). Уровень всех маркеров был повышен и у больных, обследованных на фоне прогрессирования, но различие достигало порога статистической значимости только для VEGFR 1, что, скорее всего, связано с небольшим количеством пациентов в данной подгруппе. Содер-

жание VEGF, но не его рецепторов, достоверно превышало показатели контроля также у больных доброкачественными новообразованиями почки (табл. 1).

В связи с тем, что процессы физиологического ангиогенеза связаны с полом и возрастом, перед проведением дальнейшего анализа важно отметить, что в обследованной нами группе больных новообразованиями почки никакого влияния пола и возраста на уровни исследуемых маркеров не обнаружено. В то же время у женщин группы контроля уровень VEGFR 1 достоверно отрицательно коррелировал с возрастом ($R = -0,62$, $p = 0,006$).

Наиболее выраженное увеличение сывороточной концентрации по сравнению с контролем обнаружено для VEGF: его медианный уровень у больных первичным раком почки в 1,9 раза выше, чем в контроле (табл. 1). Для VEGFR 1 и VEGFR 2 превышение составляет всего около 25%. Таким образом, единственным потенциальным серологическим маркером среди исследованных показателей активности ангиогенеза является VEGF.

В табл. 2 представлены диагностические характеристики различных пороговых уровней VEGF по отношению к первичным злокачественным и доброкачественным опухолям почки. В качестве возможных пороговых уровней были выбраны показатели 95-процентного доверительного интервала (ДИ), верхнего квартиля и 90-процентного персентили нормы.

Наилучшее соотношение чувствительности (67%) и специфичности (70%) наблюдается при пороговом уровне 365 пг/мл, соответствующем 95% ДИ среднего показателя контрольной группы. Однако данный пороговый уровень превышен также

у 70% больных доброкачественными опухолями почки, то есть специфичность по отношению к этому «патологическому» контролю составляет всего 30%.

Таким образом, проведенный анализ продемонстрировал, с одной стороны, значительное увеличение концентрации трех маркеров ангиогенеза в сыворотке крови больных не только злокачественными, но и доброкачественными новообразованиями почки. С другой стороны, специфичность их повышения недостаточна для использования данных маркеров в диагностических целях. Можно предполагать тем не менее, что изучаемые маркеры, в первую очередь VEGF, могут быть полезны для мониторинга больных, получающих антиангиогенные препараты, а также для предсказания чувствительности к такому лечению [20, 21].

В этой связи значительный интерес представляло выяснение вопроса о том, в какой мере изменение концентрации VEGF в периферической крови отражает процессы, происходящие в ткани опухоли. Нам удалось определить содержание VEGF в опухоли и гистологически неизменной ткани у 24 из 99 обследованных больных раком почки. Как и в проведенном нами ранее пилотном исследовании [17, 19], уровень VEGF был достоверно и значительно повышен по сравнению с гомологичной нормальной тканью в опухолях 96% (23 / 24) пациентов (11,1–1692; медиана — 611 пг/мг белка и 9,1–11; медиана — 48,4 пг/мг белка соответственно; $p < 0,0001$), однако значимой корреляции концентрации маркера в сыворотке крови и опухолевой ткани не обнаружено ($R = 0,33$; $p > 0,1$). Следовательно, как и при исследовании большинства биологических

маркеров, следует признать, что уровень VEGF в периферической крови является результирующей различных процессов, а не только его продукции опухолевой тканью.

Следует отметить, что уровень VEGF и VEGFR 1 в сыворотке крови больных раком почки слабо, но достоверно положительно коррелировали ($R = 0,28$; $p = 0,006$), в то время как в контрольной группе такая корреляция отсутствовала, но была выявлена положительная взаимосвязь между уровнями VEGFR 1 и VEGFR 2 ($R = 0,33$; $p = 0,019$). Таким образом, можно высказать предположение об изменении взаимосвязей между различными показателями активности ангиогенеза у больных раком почки.

На следующем этапе анализа мы оценили соотношение уровней VEGF и его рецепторов в сыворотке крови с основными показателями распространенности рака почки (табл. 3). Значимой тенденции к увеличению сывороточной концентрации VEGF с увеличением стадии заболевания не обнаружено, но можно отметить, что медианный уровень этого маркера у больных с третьей стадией достоверно превышает показатели не только пациентов с менее распространенным процессом, но также достоверно выше, чем у больных с четвертой стадией. Тем не менее уровень VEGF превышал пороговый уровень 365 пг/мл только у 73 % больных с третьей стадией, тогда как частота его превышения при I, II и IV стадиях рака почки составила 64, 70 и 68 % соответственно.

Уровень VEGFR 1 достоверно возрастал с увеличением стадии рака почки ($p = 0,018$ по тесту Краскела-Уоллиса) и был достоверно выше у больных I–II, чем у больных III–IV стадий. Уровень VEGFR 2 достоверно не зависел от стадии заболевания.

Что касается отдельных показателей распространенности рака почки по системе TNM, то достоверные различия выявлены только для VEGFR 1: его уровень был выше у больных с T₃ (опухоль распространяется на главные вены или вторгается в надпочечник или окружающую ткань, но не прорастающая почечную фасцию), чем

Таблица 3
Содержание VEGF, VEGFR 1 и VEGFR 2 в сыворотке крови больных раком почки в зависимости от показателей распространенности опухоли

Показатель распространенности	N	VEGF, пг/мл	VEGFR 1, пг/мл	VEGFR 2, нг/мл
Стадия				
I	53	511 266–823	101 74,2–114,0	11,2 8,6–23,2
II	10	481 285–508	110 93,2–115,0	15,5 7,6–18,3
III	15	835 243–2653	123 89,1–165,0	13,5 11,1–16,6
IV	16	549 300–1082	131 95,3–151,0	13,8 11,3–16,8
p		pl, II–III = 0,0005; pIV–III = 0,01	pl, II–III, IV < 0,05	p > 0,05
Распространенность опухоли (T)				
T1	49	555 292–839	101 75,7–110,0	13,9 9,6–18,3
T2	17	494 325–815	115 95,6–144,0	13,5 11,7–18,1
T3	25	523 221–996	123 95,3–165,0	12,2 8,3–14,5
T4	3	269 244–371	72 59,6–89,8	11,4 7,4–14,9
p		p > 0,05	p1–3 = 0,002	p > 0,05
Метастазы в лимфатических узлах (N)				
N0	78	529 292–857	104 83,0–125,0	13,4 9,6–17,8
N1	8	419 244–450	83,7 60,5–168,0	13,9 10,9–14,5
N2	8	563 276–948	143 107–208	10,1 6,4–14,6
p		> 0,05	p0vs2 = 0,03	p0vs2 = 0,11
Отдаленные метастазы (M)				
M0	84	510 266–839	105 83,7–130,0	13,1 8,9–16,8
M+	10	522 300–1081	119 75,8–168,0	14,2 11,3–18,1
p		> 0,1	> 0,1	> 0,1

Таблица 4
Содержание VEGF, VEGFR 1 и VEGFR 2 в сыворотке крови больных раком почки в зависимости от гистологического строения и степени дифференцировки опухоли

Критерий	N	VEGF, пг/мл	VEGFR 1, пг/мл	VEGFR 2, нг/мл
Гистологическое строение				
Светлоклеточный рак	74	508 267–857	104 87,9–151,0	13,3 8,8–16,9
Хромобластный рак	7	401 292–883	107 30,5–265,0	12,8 9,0–25,6
Папиллярный рак	8	667 486–728	125 114–135	14,6 12,2–17,4
Уротелиальный рак	3	529 235–708	54,9 21,2–62,4	12,0 8,0–15,1
Степень дифференцировки				
G1	7	823 419–1146	117 97,1–135,0	15,8 10,9–17,4
G2	49	506 288–832	103 79,0–124,0	13,0 8,7–16,7
G3	12	501 349–779	114 92,5–163,0	13,5 8,3–15,3
G4	9	524 240–1155	115 101–141	12,5 10,2–20,1

у больных с T₁ (опухоль до 7 см, ограниченная почкой), а также у пациентов с множественным поражением лимфатических узлов (N₂) по сравнению с пациентами без метастазов в лимфоузлы (N₀).

По гистологическому строению большинство злокачественных опухолей почки представляли собой светлоклеточный (80%), 7,5% — хромофобный, 8,5% — папиллярный (пять первого и три второго типа) и 3% — уротелиальный рак.

Достоверных различий сывороточных концентраций VEGF и его рецепторов в зависимости от гистологического строения и степени дифференцировки опухоли не обнаружено (табл. 4). Можно лишь отметить, что наиболее высокие медианные уровни всех маркеров наблюдались при папиллярном раке, а уровень VEGF был наиболее высоким у больных с высокодифференцированными опухолями (G1).

Заключение

При исследовании содержания VEGF и его рецепторов 1-го и 2-го типов в сыворотке крови больных опухолями почки и здоровых доноров продемонстрировано значительное увеличение концентрации этих маркеров ангиогенеза, в первую очередь самого VEGF, в сыворотке крови больных не только злокачественными, но и доброкачественными новообразованиями почки. Однако чувствительность и специфичность VEGF в качестве маркера рака почки не превышают 70%, а его уровень не зависит от стадии заболевания. Не обнаружено и значимой корреляции концентрации этого маркера в сыворотке крови и опухолевой ткани, что свидетельствует о неопухолевом происхождении по крайней мере части циркулирующего в крови VEGF. В наибольшей степени с распространенностью рака почки связан уровень растворимого рецептора VEGFR 1, однако превышение показателей контроля для этого маркера составляет не более 25%, что ограничивает его диагностические возможности. Уровень растворимого VEGFR 2, играющего, по нашим данным, значимую роль при раке мо-

лочной железы и яичников [22], при раке почки меняется незначительно.

Несмотря на вышеуказанные ограничения, мы полагаем, что изученные в данной работе маркеры, в первую очередь VEGF, могут быть полезны для мониторинга больных раком почки, получающих антиангиогенные препараты, а также для предсказания чувствительности к такому лечению.

Список литературы

1. Ainsworth N.L., Lee J.S., Eisen T. Impact of anti-angiogenic treatments on metastatic renal cell carcinoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2009. 9 (12). 1793–1805.
2. Domblides C., Gross-Goupil M., Quivy A., Ravnaud A. Emerging antiangiogenics for renal cancer. *Expert. Opin. Emerg. Drugs.* 2013. 18 (4). 495–511.
3. Moch H., Montironi R., Lopez-Beltran A., Cheng L., Mischo A. Oncotargets in different renal cancer subtypes. *Curr Drug Targets* 2015. 16 (2). 125–135.
4. Oya M. Renal cell carcinoma: biological features and rationale for molecular-targeted therapy. *Keio. J. Med.* 2009. 58 (1). 1–11.
5. Aziz S.A., Szol J.A., Adeniran A., Parisi F., Kluger Y., Camp R.L., Kluger H.M. Expression of drug targets in primary and matched metastatic renal cell carcinoma tumors. *BMC Clin. Pathol.* 2013. 13. 3.
6. Virman J.P., Bono P., Luukkaala T.H., Suneila K.L., Kujala P.M., Kellokumpu-Lehtinen P.I. Combined Angiogenesis and Proliferation Markers' Expressions as Long-Term Prognostic Factors in Renal Cell Cancer. *Clin. Genitourin. Cancer.* 2016. 14 (4). e283–e289.
7. Choueiri T.K. Factors associated with outcome in patients with advanced renal cell carcinoma in the era of antiangiogenic agents. *Clin. Genitourin. Cancer.* 2008. 6 (1). 15–20.
8. van der Mijl J.C., Mier J.W., Broxterman H.J., Verheul H.M. Predictive biomarkers in renal cell cancer: insights in drug resistance mechanisms. *Drug Resist. Updat.* 2014. 17 (4–6). 77–88.
9. Lu W., Chen H., Yel F., Wang F., Xie X. VEGF induces phosphorylation of STAT3 through binding VEGFR2 in ovarian carcinoma cells in vitro. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2006. 27 (4). 363–369.
10. Щербakov А. М., Герштейн Е. С., Короткова Е. А., Овчинникова Л. К., Овсий О. Г., Ермилова В. Д., Генс Г. П., Кушлинский Н. Е. Белки-регуляторы эпителиально-мезенхимального перехода и некоторые компоненты VEGF-сигнального пути в опухолях молочной железы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015. 160 (12). 773–778.
11. Heng D.Y., Xie W., Regan M.M., Warren M.A., Golshayan A.R., Sahi C., Eigl B.J., Ruefher J.D., Cheng T., North S. et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J. Clin. Oncol.* 2009. 27 (34). 5794–5799.
12. Sharpe K., Stewart G.D., Mackay A., Van Neste C., Rofe C., Berney D., Kayani I., Bex A., Wan E., O'Mahony F.C. et al. The effect of VEGF-targeted therapy on biomarker expression in sequential tissue from patients with metastatic clear cell renal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2013. 19 (24). 6924–6934.
13. Tran H.T., Liu Y., Zurita A.J., Lin Y., Baker-Nabb K.L., Martin A.M., Figlin R.A., Hutson T.E., Sternberg C.N., Amado R.G. et al. Prognostic or predictive plasma cytokines and angiogenic factors for patients treated with pazopanib for metastatic renal-cell cancer: a retrospective analysis of phase 2 and phase 3 trials. *Lancet Oncol.* 2012. 13 (8). 827–837.
14. Schips L., Dalpiaz O., Lipsky K., Langner C., Rehak P., Puerstner P., Pummer K., Zigeuner R. Serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin in renal cell carcinoma patients compared to a control group. *Eur. Urol.* 2007. 51 (1). 168–173; discussion 174.
15. Zurita A.J., Jonasch E., Wu H.K., Tran H.T., Heymach J.V. Circulating biomarkers for vascular endothelial growth factor inhibitors in renal cell carcinoma. *Cancer.* 2009. 115 (10 Suppl). 2346–2354.
16. van der Veldt A.A., Vrolijk L., de Haas R.R., Koolwijk P., van den Eertwegh A.J., Haanen J.B., van Hinsbergh V.W., Broxterman H.J., Boven E. Sunitinib-induced changes in circulating endothelial cell-related proteins in patients with metastatic renal cell cancer. *Int. J. Cancer.* 2011. 131 (4). E484–493.
17. Kushlinsky N.E., Trapeznikova M.F., Gershstein E.S., Glibin P.A., Kazantseva I.A., Kili-chbekov M.B. Vascular endothelial growth factor and its type 2 receptor in tumors and serum of patients with renal cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008. 145 (6). 744–747.
18. Fujita N., Okegawa T., Terado Y., Tambo M., Higashihara E., Nutahara K. Serum level and immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor for the prediction of postoperative recurrence in renal cell carcinoma. *BMC Res. Notes.* 2014. 7. 369.
19. Кушлинский Н. Е., Трапезникова М. Ф., Герштейн Е. С., Глыбин П. В., Казанцева И. А., Кычаков А. А., Морозов А. П. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецептор 2 типа при раке почки. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2008. 5. 31–33.
20. Golshayan A.R., Brick A.J., Choueiri T.K. Predicting outcome to VEGF-targeted therapy in metastatic clear-cell renal cell carcinoma: data from recent studies. *Future Oncol.* 2008. 4 (1). 85–92.
21. Kontovinis L.F., Papazisis K.T., Touplikioti P., Andreadis C., Mouratidou D., Kortsaaris A.H. Sunitinib treatment for patients with clear-cell metastatic renal cell carcinoma: clinical outcomes and plasma angiogenesis markers. *BMC Cancer.* 2009. 9. 82.
22. Герштейн Е. С., Кушлинский Н. Е. Фактор роста эндотелия сосудов как основной регулятор ангиогенеза и клинически значимый показатель при различных злокачественных новообразованиях. *Технологии живых систем.* 2013. 2. 18–33.



Диагностика и иммунофенотипические особенности бластных клеток при острых миелоидных лейкозах: экспрессия пан-миелоидных и линейно-нерестриктированных антигенов

А. Ю. Гривцова, д.б.н., с.н.с. лаборатории иммунологии гемопоэза
Н. Н. Купрышина, к.м.н., с.н.с. лаборатории иммунологии гемопоэза
М. А. Френкель, д.м.н., вед. научный сотрудник лаборатории иммунологии гемопоэза
О. А. Безнос, научный сотрудник лаборатории иммунологии гемопоэза
Н. Н. Тупицын, д.м.н., проф., зав. лабораторией иммунологии гемопоэза
О. Ю. Баранова, к.м.н., с.н.с. отдела гематологии с трансплантацией костного мозга
П. А. Зейналова, д.м.н., зав. отделом гематологии с трансплантацией костного мозга

НИИ клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва

Diagnosis and immunophenotypic features of blast cells in acute myeloid leukemia: pan-myeloid and linear-nonrestricted antigens

L. Yu. Grivtsova, N. N. Kupryshina, M. A. Frenkel, O. A. Beznos, O. Yu. Baranova, P. A. Zeynalova, N. N. Tupitsyn
Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation (N.N. Blokhin NMRCO)

Резюме

В статье рассмотрена диагностика острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), и проанализирована экспрессия на бластных клетках ОМЛ линейно-нерестриктированных и пан-миелоидных антигенов с использованием восьмицветных проточно-цитометрических протоколов Euro-Flow. При анализе первичных иммунофенотипов бластных клеток 36 больных ОМЛ установлен ряд иммунофенотипических особенностей бластов при различных FAB-вариантах острых миелоидных лейкозов. Больше процент бластных клеток с экспрессией миелопероксидазы, молекулы HLA-DR и c-kit рецептора CD117 выявлены в группе гранулоцитарных лейкозов, в то время как промиелоцитарный лейкоз демонстрировал CD123⁺-фенотип и характеризовался более выраженным процентом CD13⁺-бластов. Полученные данные могут быть использованы при отработке цитометрических протоколов для диагностического иммунофенотипирования и выявления параллелей с цитогенетическими aberrациями бластной клетки при ОМЛ. Кроме того, индивидуальный иммунофенотипический профиль бластных клеток, выявленный при первичной диагностике на основании подробного иммунологического исследования с использованием панелей Euro-Flow, может быть использован для последующего мониторинга минимальной остаточной болезни в случае ОМЛ.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, иммунофенотип, Euro-flow, проточная цитометрия.

Summary

The diagnosis of acute myeloid leukemia (AML) was examined in the article, and expression on blast cells of AML of linearly non-resolved and pan-myeloid antigens was analyzed using the eight-color Euro-Flow flow-cytometric protocols. In the analysis of primary immunophenotypes of blast cells, 36 patients with AML have a number of immunophenotypic features of blasts in various FAB variants of acute myeloid leukemias. A greater percentage of blast cells with the expression of myeloperoxidase, HLA-DR molecule and CD117 receptor c-kit were detected in the granulocyte leukemia group, while promyelocytic leukemia showed CD123⁺-phenotype and was characterized by a more pronounced percentage of CD13⁺-blasts. The data obtained can be used to develop cytometric protocols for diagnostic immunophenotyping and to identify parallels with cytogenetic aberrations of the blast cell in AML. In addition, the individual immunophenotypic profile of blast cells revealed in the primary diagnosis on the basis of a detailed immunological study using Euro-Flow panels can be used for subsequent monitoring of the minimal residual disease in the case of AML.

Key words: acute myeloid leukemia, immunophenotype, Euro-flow, flow cytometry.

Введение

Диагноз острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) в настоящее время базируется в первую очередь на данных морфо-цитохимии и цитогенетического исследований в строгом соответствии с рекомендациями ВОЗ [1], в то время как проточной цитометрии отводится роль вспомогательного исследования. Это обусловлено высокой гетерогенностью ОМЛ и отсутствием однозначных иммуно-

логических диагностических маркеров бластных клеток миелоидной природы — фенотипы бластных клеток даже в пределах одного и того же FAB-варианта весьма разнородны. Также на настоящий момент не существует единых стандартизованных протоколов иммунологической диагностики ОМЛ.

Вместе с тем современные возможности иммунологической диа-

гностики и иммунофенотипирования опухоли чрезвычайно широки. С внедрением в практику многоцветной проточной цитометрии стала возможной характеристика до 11 параметров (антигенов) на одной клетке одновременно, что позволяет выявить индивидуальный для каждого больного иммунофенотипический профиль бластной клетки. Эти данные могут быть использова-

Флуорохром	PacBlue /V450	PacOr /V500	FITC	PE	PE-cy5	Pe-cy7	APC	APC-H7
антиген	Cy*CD3	CD45	Cy*MPO	Cy*CD79a	CD34	CD19	CD7	smCD3
мкл / тест	7 мкл	5 мкл	3 мкл	5 мкл	7 мкл	5 мкл	2 мкл	3 мкл

Примечание: * — экспрессия антигена оценивается в цитоплазме, антитела вносятся вторым этапом после пермеабиллизации клеточной мембраны.

Рисунок 1. Диагностическая панель (проба A LOT) острых лейкозов в соответствии с протоколом EuroFlow.

Флуоро-хром/ антиген	PacBlue /V450	PacOr /V500	FITC	PE	PE-cy5	Pe-cy7	APC	APC-H7
1	HLA-DR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
2	HLA-DR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	CD300e	CD14
3	HLA-DR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
4	HLA-DR	CD45	nuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19
5	HLA-DR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38
6	HLA-DR	CD45	CD42a/ CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4
7	HLA-DR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9

Рисунок 2. Расширенная диагностическая панель острых миелоидных лейкозов в соответствии с протоколом EuroFlow.

В каждой пробе повторяется оценка экспрессии антигенов HLA-DR, CD45, CD34, CD117 (выделено красным), имеющих принципиальное значение для более точного выявления популяции бластных клеток при ОМЛ.

ны в качестве возможного прогноза и для оценки эффективности ответа опухоли на химиотерапию, то есть оценки минимальной остаточной болезни на основании aberrантного иммунофенотипа бластных клеток. Данный критерий с успехом используется в качестве фактора прогноза и риск-стратификации больных при острых лимфобластных лейкозах у детей [2–4], все чаще применяется также у взрослых в качестве наиболее надежного прогностического фактора и рассматривается как таковой в отношении ОМЛ [5].

Решением проблемы иммунофенотипирования и стандартизации иммунологических подходов в отношении ОМЛ представляется предложенный концепцией EuroFlow единый стандарт иммунофенотипической диагностики опухолей крови, основанный на восьмицветной проточной цитометрии [6]. В рамках данного протокола при характеристике миелоидного роста и его патологий проведен анализ комбинаций коэкспрессии 33 антигенов, ассоциированных с миелопоэзом. Для каждой пробы отобраны наиболее адекватные сочетания маркеров и флуорохромов, прописаны все детали пробоподготовки, включая сочетание флуорохромов и антител,

а также количеств реагентов и определены четкие алгоритмы настройки проточных цитометров.

В отношении острых лейкозов предложен двухэтапный диагностический подход. На первом этапе с использованием пробы ALOT (acute leukemia orientation tube) выявляется линейная принадлежность бластной клетки — лимфоидная (Т-, В-линейная), миелоидная, и далее на основании полученных данных проводится углубленная иммунофенотипическая характеристика бластной клетки. Для каждого варианта ОЛ предложены соответствующие панели из нескольких проб. Подробно диагностика ОЛ с использованием панелей консорциума EuroFlow описана нами ранее [7].

В данной статье рассмотрена диагностика ОМЛ, и проанализирована экспрессия на бластных клетках ОМЛ линейно-нереструктурированных и пан-миелоидных антигенов.

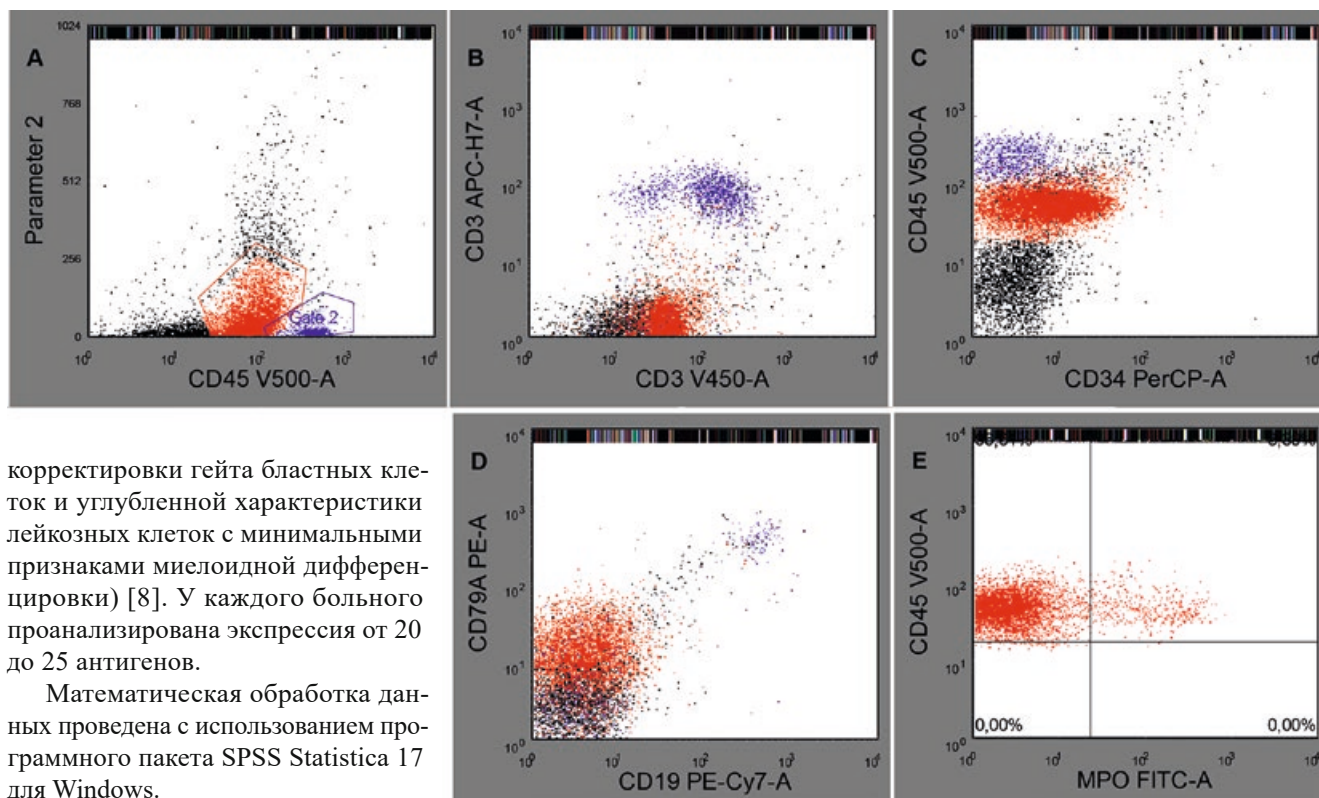
Материалы и методы

Проведена подробная иммунофенотипическая характеристика бластных клеток у 36 взрослых больных с первично диагностированным диагнозом «острый миелоидный лейкоз». Средний возраст больных составил $53,2 \pm 2,5$ года (от 22 до 78 лет). Ди-

агноз острого миелоидного лейкоза основывался на полном морфотокимическом и иммунологическом исследовании клеток костного мозга. В соответствии с FAB-вариантами больные распределились следующим образом: М0 — 8 больных; М1 — 10 случаев; М2 — 2 больных; М3 — 4; М4 — 9 пациентов и М5а — 3 случая.

На первом этапе для верификации варианта острого лейкоза в соответствии с проколом консорциума EuroFlow ставилась ориентационная проба острых лейкозов ALOT (acute leukemia orientation tube), рис. 1, включающая оценку экспрессии миелопероксидазы, цитоплазматических CD79a и CD3, мембранных CD7 и CD3, а также CD34.

В случае подтверждения диагноза острого лейкоза и отсутствия признаков лимфоидной рестрикции бластов проводилась их углубленная иммунофенотипическая характеристика на основании постановки и анализа семи уточняющих проб протокола EuroFlow в соответствии с панелью острых миелоидных лейкозов (рис. 2). В качестве каркасных (повторяющихся в каждой пробе) в данном протоколе используются антитела к антигенам CD45 (гейтирование бластных клеток), HLA-DR, CD34, CD117 (возможность



корректировки гейта бластных клеток и углубленной характеристики лейкозных клеток с минимальными признаками миелоидной дифференцировки) [8]. У каждого больного проанализирована экспрессия от 20 до 25 антигенов.

Математическая обработка данных проведена с использованием программного пакета SPSS Statistica 17 для Windows.

Результаты и обсуждение

На первом этапе каждому больному проводилась верификация линейной принадлежности бластных клеток на основании постановки ориентационной пробы острых лейкозов ALOT. На рис. 3 приведен пример подтверждения миелоидной природы бластных клеток в соответствии с данным подходом.

Морфологически гиперклеточные образцы (более 200×10^3 кл./мкл) получены у пяти больных, наибольшей была клеточность в двух случаях М1 ОМЛ ($359,0$ и $697,0 \times 10^3$ кл./мкл). Гипоклеточным был костный мозг у трех больных (М2, М3, М4 варианты ОМЛ). Случаи невысокого (менее 30,0%) бластоза выявлены у четырех больных (два случая М0, М1, М4). Гранулоцитарный и эритроидный ростки практически у всех больных были сужены. Суммарное количество клеток гранулоцитарного ряда не превышало 39,0% и только в одном случае (М0, подозрение на бластный криз МПЗ) составило 59,0%. Число клеток красного ряда было близко к нормальным показателям у семи больных, у двух пациентов их число было увеличено (более 37%, М0- и М1-варианты).

Рисунок 3. Диагностика ОЛ с использованием пробы ALOT. Острый миелоидный лейкоз. На рисунке представлен пример диагностики острого лейкоза с использованием диагностической пробы острых лейкозов ALOT протокола EUROFlow.

А. Гейтирование популяции бластных клеток (гейт бластов выделен красным цветом) и популяции лимфоцитов (выделена синим) на основании экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45, лимфоциты использованы в качестве внутреннего контроля.

В. Экспрессия пан-Т-клеточных антигенов — цитоплазматических CD3 (ось абсцисс, краситель V500) и мембранных CD3 (ось ординат, тандемный флуорохром аллофикоцианин — хинин 7) выявлена только на лимфоцитах.

С. Только 20% бластных клеток демонстрировали слабую экспрессию стволовомклеточного антигена CD34 (ось абсцисс, флуорохром PerCP).

Д. Экспрессия пан-В-клеточных антигенов цитоплазматических CD79a (ось ординат, флуорохром-фикоэритрин) и CD19 (ось абсцисс, тандемный флуорохром — фикоэритрин-Н 7), как и в случае с Т-клеточными антигенами выявляется только на лимфоцитах.

Е. 3,39% бластных клеток демонстрируют экспрессию миелопероксидазы (ось абсцисс, флуорохром — флуоресцеинизотионат), АГ+-бласты — правый верхний квадрант цитограммы.

По совокупности данных морфо-цитохимии и иммунофенотипирования (CD13+CD117+CD33±) установлен диагноз ОМЛ, М1.

При анализе экспрессии пан-миелоидных, антигенов клеток-предшественников и линейно-нерестриктированных антигенов установлен ряд особенностей иммунофенотипа различных FAB-вариантов ОМЛ в данной выборке больных. Наиболее выраженная экспрессия миелопероксидазы характеризовала группу гранулоцитарных лейкозов, в то время как бластные клетки промиелоцитарного лейкоза демонстрировали наименьший процент экспрессии антигена. Сходная тенденция отмечена и для антигенов CD7 и CD34 (последнее является одним из диагностических

критерием для М3 наряду с отсутствием HLA-DR). Случаи CD34-негативности также выявлены при М0- (2 из 8) и при М1- (4 из 9) вариантах ОМЛ. Подобное отсутствие экспрессии стволовомклеточного антигена при недифференцированном ОМЛ и ОМЛ с минимальными признаками дифференцировки может рассматриваться как aberrantный иммунофенотип, поскольку на данном этапе дифференцировки клеток миелоидного роста они являются CD34⁺ в нормальном онтогенезе [9].

Экспрессия антигена главного комплекса гистосовместимости второго

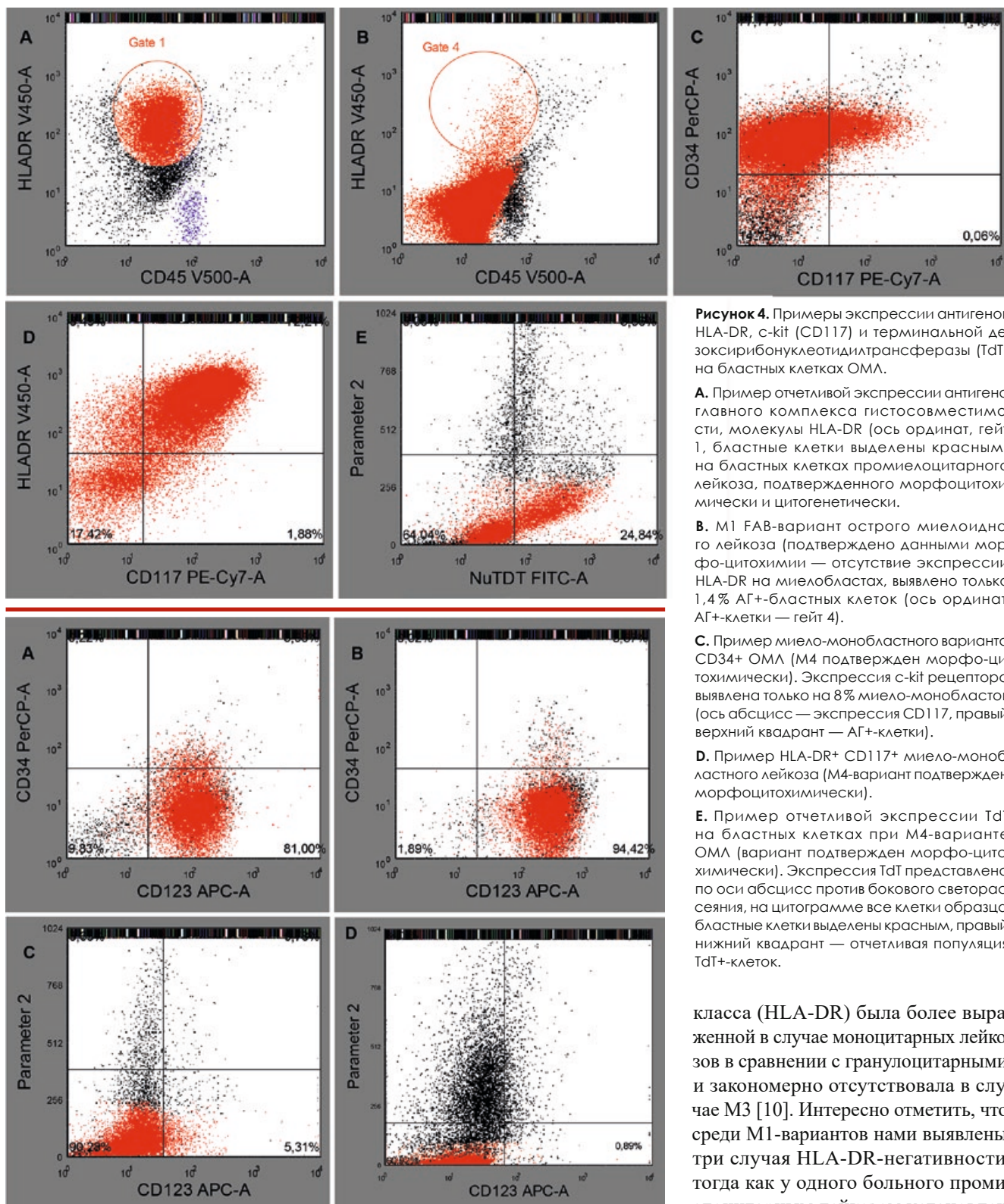


Рисунок 4. Примеры экспрессии антигенов HLA-DR, c-kit (CD117) и терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT) на бластных клетках ОМЛ.

А. Пример отчетливой экспрессии антигена главного комплекса гистосовместимости, молекулы HLA-DR (ось ординат, гейт 1, бластные клетки выделены красным) на бластных клетках промиелоцитарного лейкоза, подтвержденного морфоцитохимически и цитогенетически.

В. M1 FAB-вариант острого миелоидного лейкоза (подтверждено данными морфо-цитохимии — отсутствие экспрессии HLA-DR на миелоблестах, выявлено только 1,4% АГ+-бластных клеток (ось ординат, АГ+-клетки — гейт 4).

С. Пример миело-монобластного варианта CD34+ ОМЛ (M4 подтвержден морфо-цитохимически). Экспрессия c-kit рецептора выявлена только на 8% миело-монобластов (ось абсцисс — экспрессия CD117, правый верхний квадрант — АГ+-клетки).

Д. Пример HLA-DR+ CD117+ миело-монобластного лейкоза (M4-вариант подтвержден морфоцитохимически).

Е. Пример отчетливой экспрессии TdT на бластных клетках при M4-варианте ОМЛ (вариант подтвержден морфо-цитохимически). Экспрессия TdT представлена по оси абсцисс против бокового светорассеяния, на цитограмме все клетки образца, бластные клетки выделены красным, правый нижний квадрант — отчетливая популяция TdT+-клеток.

класса (HLA-DR) была более выраженной в случае моноцитарных лейкозов в сравнении с гранулоцитарными и закономерно отсутствовала в случае M3 [10]. Интересно отметить, что среди M1-вариантов нами выявлены три случая HLA-DR-негативности, тогда как у одного больного промиелоцитарным лейкозом установлен HLA-DR⁺-фенотип бластов (рис. 4 А, В), что, как и в случае с CD34, может явиться критерием aberrantности бластов.

Экспрессия c-kit-рецептора CD117 ассоциируется, согласно данным литературы, с патологическим клоном при ОМЛ, и лишь незначительное коли-

Рисунок 5. Примеры экспрессии антигена CD123 на бластных клетках ОМЛ.

А, В. Мономорфная экспрессия рецептора ИЛ-3 (CD123) на бластных клетках у 2 больных с морфо-цитохимически и цитогенетически подтвержденным вариантом промиелоцитарного лейкоза. Экспрессия CD123 (ось абсцисс) представлена в параллели с CD34 (ось ординат), у обоих больных бластные клетки демонстрируют фенотип CD123⁺⁺CD34⁻ (АГ+ популяция — нижний правый квадрант, количество CD34⁺ бластов у одного больного 9,0%, а у второго — 3,7%.

С, Д. Примеры отсутствия экспрессии CD123 на миелоблестах (экспрессия CD123 — ось абсцисс, показатель SSC (боковое светорассеяние), ось ординат), на цитограммах выведены все клетки образца, и в случае M0 (С) и в случае M1 (D) CD123⁺ бласты составляют менее 5,0%.

чество нормальных костно-мозговых предшественников являются CD117⁺ [8, 11–13].

Экспрессия CD117 в большинстве случаев была отчетливой, средний процент АГ⁺-бластов всей анализируемой группы составил 52,0 ± 4,7%. Большой процент экспрессии антигена выявлен в случае М0–М2-вариантов, при этом достоверность отличий в отношении CD117⁺-бластов установлена при сравнении М1- и М4-вариантов (73,5 ± 5,9, n = 10 и 36,2 ± 9,6, n = 9 соответственно; p = 0,004). В 55,0% случаев М4 (5 из 9 больных) количество CD117⁺-бластов составило менее 30,0%, а у двух больных количество CD117⁺-клеток составило менее 10,0% негативных (рис. 4 D). Вместе с тем в отдельных случаях М4-экспрессия CD117 на бластных клетках была мономорфной (рис. 4 C).

УВ отношении пан-миелоидных антигенов установлено следующее. Наибольший процент CD13⁺-бластов выявлен в случае промиелоцитарного лейкоза, относительно более низкий процент АГ⁺-бластов демонстрировала группа гранулоцитарных лейкозов.

Сопоставление количества CD33⁺-бластов не выявило различий в анализируемых группах (М0–М1, М3 и мело-монобластные). Менее 15% АГ⁺-бластных клеток выявлено в единичных случаях (1 — М0, 1 — М3, 1 — М5).

Одним из возможных критериев аберрантности опухолевых бластов при ОМЛ может служить экспрессия терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT), экспрессия которой в норме может присутствовать только на очень ранних этапах дифференцировки клеток миелоидного ростка и более типична для лимфоидных клеток-предшественников [14]. Вместе с тем имеются данные о благоприятной прогностической значимости экспрессии TdT на популяции клеток остаточной опухоли [15]. Нами выявлены четыре случая ОМЛ, когда бластные клетки были TdT⁺ (2–М1, М4 и М5а, рис. 4 E).

Особого внимания в отношении детальной характеристики бластных клеток при ОМЛ заслуживают антигены CD123 и CD38 (пробы 5 и 6 протокола EuroFlow). Данные

антигены ассоциируются большинством исследователей с популяцией лейкозных стволовых (наиболее химиорезистентного клона), которые фенотипически характеризуются как CD34⁺CD123⁺CD38[–]-клетки [16].

В ходе анализа экспрессии данных антигенов установлено, что большинство случаев М3 демонстрирует CD123⁺⁺ (рис. 5 А, В), в то время как бластные клетки М0–М2 и мело-монобластной группы лейкозов в большинстве случаев были CD123[–] (рис. 5 С, В). Достоверно более высокий процент CD38⁺-бластов выявлен для групп М1 и М4 в сравнении с М3 (79,5 ± 7,6 против 16,6 ± 8,8% и 62,5 ± 10,0 против 16,6 ± 8,8% соответственно; p < 0,003). Различия в количестве CD123⁺-бластов стремились к достоверным при сравнении групп М4 и М3 (p = 0,07). Следует отметить, что в одном случае М1 и М4 большинство бластных клеток были CD123⁺.

Таким образом, широкое иммунофенотипическое исследование бластных клеток при ОМЛ с использованием подходов EuroFlow является целесообразным. С использованием данного подхода выявлен ряд иммунофенотипических особенностей различных FAB-вариантов ОМЛ. Установлено, что больший процент бластных клеток с экспрессией миелопероксидазы, молекулы HLA-DR и c-kit рецептора CD117 выявляется в группе гранулоцитарных лейкозов, в то время как промиелоцитарный лейкоз демонстрировал CD123⁺⁺-фенотип и характеризовался более выраженным процентом CD13⁺-бластов. Полученные данные по особенностям иммунофенотипа могут быть использованы в дальнейшем при отработке цитометрических протоколов для диагностического имму-

нофенотипирования и выявления параллелей с цитогенетическими aberrациями бластной клетки при ОМЛ. Также, что практически более значимо, индивидуальный иммунофенотипический профиль бластных клеток, выявленный при первичной диагностике на основании подробного иммунологического исследования может быть использован для последующего мониторинга минимальной остаточной болезни.

Список литературы

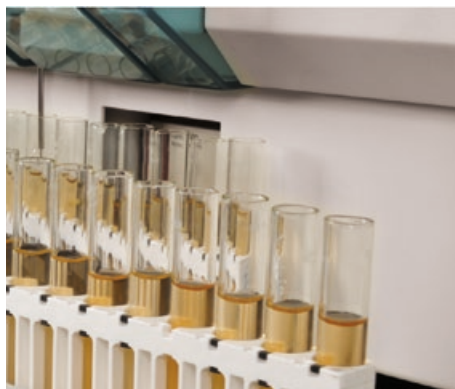
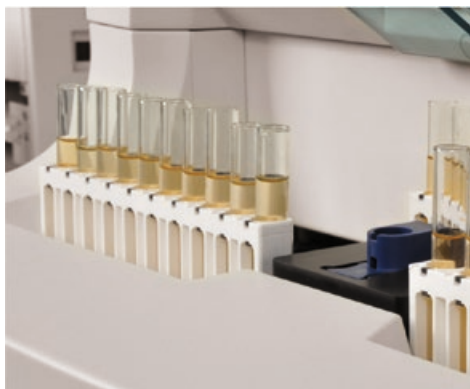
1. D. A. Arber, A. Oraz, R. Hasserjian et al. — Blood. 2016. — V. 127, N20, 2391–2405.
2. Borowitz M., Devidas M., Hunger SP., et al. — Blood. — 2008. — 11 (12). — 5477–85.
3. G. Basso., Veltroni M., Printz D., et al. — J. Clin. Oncol. — 2009. — 27 (3). — 5168–74.
4. О. А. Безнос, Л. Ю. Гривцова, А. В. Попа и соавт. — Клиническая онкогематология. — 2017. — Т. 10, № 2, 158–169.
5. Campos L., Aanei C., Flandrin-Gresta P., Guyotat D. — Haematopoiesis immunology. — 2013. — 11 (1/2). — 8–32.
6. van Dongen J. J. M., Lhermitte L., Bottcher S., et al. — Leukemia. — 2012. — 26 (9), 1908–1975.
7. Тупицын Н. Н., Гривцова Л. Ю., Купрышина Н. А. — Иммунология гемопоэза, 2015. — 13 (1). — 31–62.
8. Sandes A. F., Kerbauy D., Matarraz S., et al. — Cytometry part B. — 2013. — 84B. — 157–166.
9. B. Brando., A. Gatti. — Haematopoiesis immunology. — 2014. — 12 (1). — 42–63.
10. A. Orfao., Chillon M. C., Bortoluci A. M. et al — Hematologica. — 1999. — 84: 405–412.
11. Muroi K., Nakamura M., Amemiya Y., Suda T., Miura Y., Leuk Lymphoma. 1995 Jan; 16 (3–4): 297–305.
12. B. Brando., A. Gatti. — Haematopoiesis immunology. — 2014. — 12 (1). — 42–63.
13. Al-Mawali A., Gillis D., Hissaria P., et al. — Am J Clin Pathol. — 2008, 129: 934–945
14. Kim DY, Park HS, Choi EJ et al. — Blood Res. 2015 Dec; 50 (4): 227–34.
15. Patel KP, Khokhar FA, Muzzafar T et al. — Mod Pathol. 2013; 26 (2): 195–203.
16. Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG. Blood 2009, 114: 1150–1157.



DIRUI

ГИБРИДНЫЙ АНАЛИЗАТОР МОЧИ DIRUI FUS-2000

www.dirui-rus.com

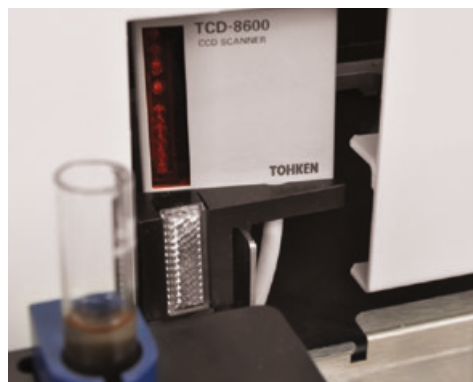


Совмещение
биохимического анализа
и микроскопии осадка мочи
в одном приборе

- 240 тестов/час в режиме анализа тест-полосок
- 120 тестов/час в режиме микроскопии осадка



- Прост в работе
- Прост в обслуживании
- Удобный интерфейс



Екатеринбург: ул. Ясная, 35, тел.: +7 (343) 231-79-36
Москва: ул. Новодмитровская, 5А, стр. 1, тел.: +7 (495) 287-89-80
E-mail: dirui@omt-ural.ru



Биохимический анализ мочи с использованием тест-полосок

Для анализа индикаторных тест-полосок используется принцип фотоэлектрической колориметрии. Благодаря автоматической загрузке и точечному распределению пробы при проведении измерений и анализов можно предотвратить попадание света извне, продлить срок эксплуатации аппарата, увеличить точность, чувствительность, стабильность работы и сократить влияние внешнего освещения или аномального окраса образца.

- Объем пробы: минимальный объем 2 мл, аспирационный объем 1 мл.
- Параметры анализа: уробилиноген, билирубин, кетоны, кровь, белок, нитриты, лейкоциты, глюкоза, pH, креатинин, кальций, аскорбиновая кислота, микроальбумин, удельный вес, цвет, мутность.
- Принцип: фотоэлектрическая колориметрия.
- Длины волн: 525, 572, 610, 660 нм.
- Максимальная загрузка полосок: 200 тест-полосок.



Анализ форменных элементов мочи

В работе анализатора FUS-2000 при проведении анализа форменных элементов мочи применяется система потоковой обработки искусственным интеллектом изображений, полученных под микроскопом. Отлаженная технология автоматической идентификации форменных элементов позволяет быстро выбрать необходимое изображение форменного элемента и определить его категорию в соответствии с морфологией, текстурой и частотным диапазоном «частицы».

- Объем пробы: минимальный объем 3 мл, аспирационный объем 1,8 мл.
- Параметры анализа: эритроциты, лейкоциты, плоский эпителий, неплоский эпителий, гиалиновые цилиндры, неклассифицированные цилиндры, кристаллы, слизь, бактерии, дрожжи, скопление лейкоцитов, сперматозоиды.
- Принцип: проточная цитометрия, технология автоматического распознавания форменных элементов.



Технические характеристики

Загрузка проб	50 / 270 проб по выбору
Производительность	В режиме анализа тест-полосок: 240 тестов в час В режиме анализа осадка мочи: 120 тестов в час В комбинированном режиме: 120 тестов в час
Технология проведения анализов	Анализ форменных элементов мочи: технология потокового изображения Химический анализ: использование альбедометра SG: использование рефрактометра Мутность: метод рассеивания света Цвет: использование цветовой модели RGB
Внешний порт	RS-232, USB
Возможность подключения	ЛИС / БИС
Вес, кг	82
Размеры, мм	779 (длина) × 688 (ширина) × 584 (высота)
Принтер	Внешний принтер

Персонализированная оценка особенностей митохондриальной ДНК

А. С. Воронкова, научный сотрудник НИЛ общей патологии

Н. А. Литвинова, с. н. с. НИЛ общей патологии

В. С. Сухоруков, д.м.н., проф., зав. НИЛ общей патологии

ОСП — научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю. Е. Вельтищева ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

Personalized assessment of mitochondrial DNA features

A. S. Voronkova, N. A. Litvinova, V. S. Sukhorukov

Scientific Research Institute of Pediatrics of Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov, Moscow, Russia

Резюме

В статье описаны результаты секвенирования митохондриальной ДНК, которое проводилось в группе не связанных между собой пациентов с диагнозом «митохондриальная энцефаломиопатия». Значение индивидуальных генетических особенностей рассмотрено на примере двух пациентов различной этнической принадлежности. Несмотря на то что достоверно патогенных вариантов выявлено не было, мы обнаружили ряд индивидуальных особенностей митохондриальной ДНК у каждого пациента, которые могут иметь клиническую значимость. На примере описанных случаев рассматриваются современные подходы персонализированной диагностики. Кроме того, продемонстрирована тесная связь лабораторных и постлабораторных методик в проведении молекулярно-генетических исследований.

Ключевые слова: дети, энцефаломиопатии, митохондрии, митохондриальная ДНК, секвенирование.

Summary

In the article, the results of mitochondrial DNA sequencing in the group of unrelated patients with mitochondrial encephalomyopathy diagnosed are presented. Significance of individual genetic particularities is evaluated through example of two patients with different ethnical background. In spite of not revealing confirmed pathogenic variants, we found several individual particularities of mitochondrial DNA, which may have clinical significance, in each patient. Through these examples modern approaches of personalized diagnostics are considered. In addition, robust relationship between laboratory and post-laboratory methodics in molecular genetic analysis are demonstrated.

Key words: children, encephalomyopathy, mitochondria, mitochondrial DNA, sequencing.

Митохондрии — это двухмембранные органеллы, встречающиеся во всех ядерных клетках. Они ответственны за многочисленные внутриклеточные процессы: биосинтез железосерного кластера, метаболизм кальция, апоптоз, но в первую очередь за продукцию клеточной энергии в форме аденозинтрифосфата (АТФ) путем окислительного фосфорилирования. Эта функция осуществляется за счет особой молекулярной системы — электронно-транспортной дыхательной цепи. Респираторная цепь состоит из четырех мультидоменных комплексов (I–IV) и двух мобильных переносчиков электронов (убиквинон и цитохром c). Эта система создает трансмембранный градиент протонов, который в дальнейшем используется белком, известным как комплекс 5 (АТФ-синтаза), для синтеза АТФ [5].

Важной особенностью функционирования митохондрий является наличие собственного полуавтоном-

ного генома. Митохондриальная ДНК (мтДНК) представляет собой двухцепочечную кольцевую молекулу размером в 16 569 пар оснований. МтДНК полиплоидна, количество ее копий может варьироваться от нескольких сотен до тысяч в зависимости от уровня энергопотребления конкретной клетки.

В ходе эволюционного эндосимбиотического преобразования большая часть генов митохондрий мигрировала в ядерный геном. Непосредственно в органелле остались гены, кодирующие два наиболее гидрофобных комплекса респираторной цепи (цитохромоксидазу и цитохром b), 22 гена транспортных РНК (тРНК) и два гена рибосомной РНК (рРНК). Остальные гены полипептидных субъединиц дыхательных комплексов, а также ответственные за транскрипцию, трансляцию и другие процессы митохондриальной жизнедеятельности гены локализованы в ядерном геноме.

Митохондриальный геном высокоэффективен: около 93 % его последовательностей являются кодирующими. Некодирующие элементы локализованы в структуре под названием «контрольный регион». Именно там находятся ориджины репликации, транскрипционные факторы и другие регуляторные единицы.

Собирательный термин «митохондриальные заболевания» означает клинически гетерогенную группу нарушений, вызванных дефектами дыхательной цепи митохондрий и ассоциированных с мутациями в митохондриальных генах. Ввиду близости к комплексам респираторной цепи и, как следствие, токсичным продуктам ее деятельности — активным формам кислорода, в митохондриях высок уровень повреждения генетического материала. МтДНК находится под постоянным действием ДНК-репарирующих ферментов. В связи с высоким уровнем мутаций и репараций мтДНК именно она яв-

ляется источником большинства патогенных вариантов, ведущих к клиническим проявлениям. Эффекты митохондриальных мутаций можно разделить на следующие группы: 1) дефекты генов комплексов дыхательной цепи; 2) дефекты вспомогательных генов (тРНК и рРНК) [8].

Из классических митохондриальных синдромов два — Кернса-Сейра и Пирсона — обусловлены масштабными делециями. Еще два — MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия, лактатацидоз, инсультоподобные эпизоды) — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся проявлениями, перечисленными в названии, и сопровождающееся полиморфной симптоматикой (диабетом, судорогами, снижением слуха, сердечными заболеваниями, низким ростом, эндокринопатиями, непереносимостью физических нагрузок и нейропсихиатрическими отклонениями) и MERRF (миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами) — основной симптомокомплекс которого включает различные виды эпилептических приступов, мозжечковую атаксию и прогрессирующую мышечную слабость. Синдромы NARP и Ли связаны с мутациями непосредственно в белок-кодирующих генах. Для большинства же митохондриальных заболеваний на сегодняшний день не существует достоверных корреляций генотип-фенотип. В связи с этим установление генетического диагноза может быть затруднено и для многих пациентов остается недостижимым [7].

В среднем каждый человек несет около 30 отличий мтДНК от принятой референсной последовательности. В зависимости от этнической принадлежности число отклонений от референса может достигать 100 и более вариантов [2]. Большинство из них имеют высокую встречаемость в субпопуляциях и поэтому признаны непатогенными. Подобные популяционные полиморфизмы крайне консервативны, они возникали в течение тысячелетий по мере расселения человечества и отражали необходимую адаптивную трансформацию митохондрий к изменяющимся услови-

ям среды. Взаимосвязанный набор популяционных вариантов, условно представляющий собой паттерн наследования дискретной материнской линии, получил название «гаплогруппа». На сегодняшний день принято выделять 25 основных гаплогрупп, которые вместе составляют филогенетическое древо, восходящее к митохондриальной Еве. Также существуют несколько сотен субгаплогрупп, число которых продолжает увеличиваться по мере накопления информации о генетических особенностях различных этнических групп. Следует отметить, что российские этносы крайне скудно представлены в международных базах данных, что существенно усложняет анализ митохондриальных вариантов. Несмотря на то что гаплогрупповой полиморфизм изначально являлся полезным, то есть увеличивал приспособленность человека к соответствующей среде, в современных условиях жизни (резко и кардинально изменившихся с эволюционной точки зрения) и при активном смешении этносов гаплогруппы с высокой долей вероятности начали играть несколько иную роль. Существуют многочисленные литературные данные о том, что гаплогруппа может влиять на риск развития рака, метаболических расстройств, заболеваний мозга, иммунной системы, психических заболеваний, воспалительных процессов и сепсиса. Анализ гаплогруппы представляет собой один из важнейших инструментов оценки митохондриального статуса исследуемого пациента [6].

В то же время практический любой человек является носителем в среднем 2–5 редких или новых вариантов, которые могут быть ассоциированы с заболеваниями или не описаны в литературе [1]. Каждый из таких вариантов может являться определяющим фактором при развитии заболевания. В связи с этим корректная интерпретация потенциальной патогенности редких и новых вариантов крайне важна для выяснения их клинической значимости. В данной статье будут рассмотрены примеры митохондриальных заболеваний, на которых будут продемонстрированы современные подходы персонализированной молекулярно-генетической диагностики.

Материалы и методы

Были исследованы образцы крови двух пациентов детского возраста с клиническим диагнозом «митохондриальная энцефаломиопатия». Проводилось секвенирование полного митохондриального генома методом Сэнгера с детекцией капиллярным электрофорезом.

ДНК выделялась из периферической крови. Далее проводилась амплификация мтДНК с использованием 50 пар праймеров, полученные фрагменты секвенировались с помощью единого праймера к последовательности M13 с использованием BigDye Terminator (Applied Biosystems, США) на генетическом анализаторе ABI 3500.

Базы данных и инструменты анализа митохондриальных вариантов

Полученные данные сравнивались с пересмотренной Кембриджской референсной последовательностью (rCRS) GenBank NC_012920 gi:251831106.40.4. Было использовано программное обеспечение Applied Biosystems: Sequencing Analysis 6, Seqscape Software 3.

Для анализа выявленных отличий от референсной последовательности мы использовали международные базы данных PhyloTree, MITOMAP, Human Mitochondrial Genome Database, OMIM.

PhyloTree (www.phylotree.org) содержит наиболее полную информацию о митохондриальном филогенетическом древе человека. Частота встречаемости вариантов в разных гаплогруппах неодинакова. Если редкие варианты обычно встречаются в определенной гаплогруппе, то низкие аллельные частоты могут быть связаны с недостаточной этнической представленностью в базе данных. Зачастую у одного человека могут обнаруживаться несколько гаплогрупповых мотивов. Гаплогруппу принято определять по доминирующему мотиву, при этом варианты, ассоциированные с другими гаплогруппами, считаются непатогенными.

MITOMAP (www.mitomap.org/mitomap) содержит данные как публичных, так и коммерческих ресур-

сов; является основным источником информации по митохондриальным вариантам. Все варианты в нем разделены на две категории: полиморфизмы и мутации. К полиморфизмам относятся непатогенные, соматические и неопубликованные варианты. К мутациям относятся подтвержденные патогенные или ассоциированные с каким-либо заболеванием варианты.

Оценка консервативности локуса производится также с помощью сервиса MITOMAP. Оценивается в случае, если вариант находится в кодирующей части митохондриального генома. Представляет собой процент видов, у которых есть исследуемый аллель. Мы проводим сравнение со следующими видами: *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Mus musculus* / *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Caenorhabditis elegans*, and *Saccharomyces cerevisiae*.

Human Mitochondrial Database (hmtDB) (www.hmtdb.uniba.it) содержит около 30 тысяч митохондриальных геномов и является важным инструментом для определения частоты встречаемости вариантов. Для определения варианта мтДНК как редкого используется пороговая аллельная частота $\leq 0,2\%$. Следует отметить, что представленность разных этнических групп (и, соответственно, гаплогрупп) на данном ресурсе сильно разнится. Некоторые варианты могут оказаться редкими только в связи с недостаточной представленностью российской популяции.

OMIM (www.omim.org) — сравнительная постоянно пополняемая база человеческих генов и клинических фенотипов. Кроме полной информации о всех известных менделевских заболеваниях, содержит данные о всех основных митохондриальных генах и их нарушениях.

PolyPhen (genetics.bwh.harvard.edu/pph2) — *in silico* инструмент для предсказания потенциальной вредности аминокислотной замены. Оценивает вариант от нуля (непатогенный) до единицы (патогенный).

Provean (provean.jcvi.org) — *in silico* инструмент для предсказания потенциальной вредности аминокис-

лотной замены. Оценка производится на основании порогового значения: оценки менее $-2,5$ свидетельствуют в пользу патогенности варианта.

Sift (sift.jcvi.org) — *in silico* инструмент для предсказания потенциальной вредности аминокислотной замены. Оценивает вероятность изменения функции белка при аминокислотной замене. Достоверной считает оценку (вероятность) $< 0,05$.

Классификация вариантов мтДНК в нашем исследовании

При интерпретации полученных вариантов мтДНК основным документом является рекомендация по классификации митохондриальных вариантов, выпущенная в 2012 году исследовательской группой Американского колледжа генетики и геномики [11]. В ней предлагается рассматривать варианты в рамках трех групп.

1. **Непатогенный вариант.** Он обозначен на MITOMAP как полиморфизм; нет сведений о его ассоциированности с заболеваниями в популяционных или семейных исследованиях; его аллельная частота превышает $0,2\%$.
2. **Неклассифицированный вариант.** Любой вариант, соответствующий по крайней мере одному из следующих критериев: а) новый вариант; б) редкий вариант, который обозначен на MITOMAP как полиморфизм, но его нет в базе данных или частота его встречаемости менее $0,2\%$; в) редкий вариант, обозначенный в литературе или на MITOMAP как мутация на основании исследования одной семьи или одной статьи без функциональных исследований его патогенности.

Неклассифицированные варианты в этой категории должны быть дополнительно оценены *in silico* инструментами по предсказанию структуры белка или с помощью других баз данных: а) для миссенс-вариантов, эволюционной консервативности и компьютерных алгоритмов используют *in silico* предсказания патогенности; б) если вариант мтДНК встречается в одном из митохондриальных тРНК-генов, используется база данных Mamit-tRNA.

3. **Патогенный вариант.** Он обозначен как подтвержденная мутация на MITOMAP; был описан в нескольких клинических исследованиях отдельных пациентов или семей; содержит функциональные исследования.

Результаты и обсуждение

Полученные отличия от референсной последовательности (rCRS) представлены в табл. 1. У пациента 1 найдены 16 вариантов (гаплогруппа H2a); у пациента 2 — 41 вариант (гаплогруппа I1).

Разница в количестве найденных вариантов объяснима. Референсная последовательность rCRS представляет собой результат секвенирования мтДНК одного человека европейской расы, которое было произведено в 1981 году в Кембриджском университете под руководством Фредерика Сэнгера (Frederick Sanger). Референсный геном относится к гаплогруппе H2a2a1. Очевидно, что при исследовании индивидов, которые принадлежат к той же либо близкой гаплогруппе, число отличий от референса будет меньшим, чем при исследовании пациентов с иными гаплогруппами.

Основная задача нашего исследования заключается в выявлении и анализе вариантов, ответственных за формирование патогенного фенотипа для каждого пациента.

На первом этапе были исключены все варианты, ассоциированные с гаплогруппой, и другие гаплогрупповые мотивы. У пациента 1 к гаплогрупповым относятся 14 полиморфизмов ($87,5\%$), а у пациента 2 — 38 полиморфизмов ($92,7\%$).

Также были исключены крайние полиморфные варианты, ранее описанные в контрольном регионе, в позициях 303–315, 522–523, 574, 16180–16193 и 16519.

Оставшиеся варианты A10732T, 11384delCTT, C12562G, 6479insAA были проанализированы на предмет потенциальной патогенности. В первую очередь были рассмотрены встречаемость данных вариантов в популяции и обозначение в базе данных MITOMAP (табл. 2).

Как видно из таблицы, все варианты являются редкими (и обозначены

на МІТОМАР как полиморфизмы) или новыми. Согласно используемой нами классификации они относятся к категории «неклассифицированные варианты».

Следующим этапом анализа стала оценка потенциального влияния вариантов на митохондриальную функцию (табл. 3).

Вариант **6479insAA**, выявленный у первого пациента, приводит к сдвигу рамки считывания. Данный вариант локализован ближе к началу гена (рис. 1), следовательно, значительная часть полипептидной структуры синтезируется с нарушениями. В таких случаях принято считать, что вариант с высокой вероятностью приводит к потере функции белка.

Дыхательный комплекс IV или цитохром с-оксидаза — крупный трансмембранный протеин, терминальный комплекс электронно-транспортной цепи митохондрий. Ее функция заключается в переносе электронов с цитохрома с на кислород с образованием воды. При восстановлении кислорода во внутреннее пространство митохондрии переносятся четыре иона H^+ , таким образом фермент участвует в создании протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ. Цитохром-оксидаза состоит из трех основных субъединиц и 10 дополнительных. Субъединица I является главным кластером цитохромоксидазы: она содержит окислительно-восстановительные центры и протонные каналы. Протонные каналы образуются с помощью специфической посттрансляционной модификации аминокислот в позициях 240 и 244 [12]. Триплеты, кодирующие эти аминокислоты, затрагиваются сдвигом рамки считывания в данном случае, соответственно и рассматриваемый генный вариант, скорее всего, оказывает патогенное влияние на функционирование комплекса IV.

Вариант **A10732T**, обнаруженный у второго пациента, приводит к замене аспарагиновой кислоты на валин в 88-й позиции полипептидной цепи субъединицы ND4L НАДН-дегидро-

Таблица 1
Варианты, выявленные у пациентов при сравнении с rCRS

Пациент 1. Гаплогруппа H2a	Пациент 2. Гаплогруппа I1	
A263G	A73G	T10238C
310insCC	T199C	A10398G
C575T	T204C	A10732T
A750G	A211G	G11016A
A751G	T250C	11384delCTT
G951A	A263G	G11719A
6479insA	315insC	G11887A
A8860G	455insT	G12501A
A9052G	A750G	C12562G
A9644G	A1438G	C12705T
G9966A	G1719A	A13780G
C12562G	A2706G	C14766T
A15326G	A4529T	G15043A
T16124C	A4769G	A15326G
C16354T	G5783A	A15924G
T16519C	A5836G	G16129A
	C7028T	C16223T
	G8251A	T16311C
	A8860G	G16391A
	G9966A	T16519C
	T10034C	

Таблица 2
Встречаемость вариантов-кандидатов в базах данных

	Вариант	Аллельная частота hmtDB, %	Обозначение в МІТОМАР
Пациент 1	6479insAA	0	Отсутствует
	C12562G	0,02	Полиморфизм
Пациент 2	A10732T	0	Отсутствует
	11384delCTT	0	Отсутствует
	C12562G	0,02	Полиморфизм

Таблица 3
Информация о локализации вариантов и характере изменений белка

	Вариант	Локализация	Результат замены
Пациент 1	6479insAA	COI	Сдвиг рамки считывания
Пациент 1, 2	C12562G	ND5	L76V
Пациент 2	A10732T	ND4L	D88V
Пациент 2	11384delCTT	ND4	Отсутствие 209L

геназного комплекса. Эта позиция высококонсервативна: согласно базе МІТОМАР межвидовой уровень консервативности составляет 97,78 %.

При данной замене, вероятнее всего, возникают физико-химические изменения в полипептидной структуре. Структура валина отличается от ас-

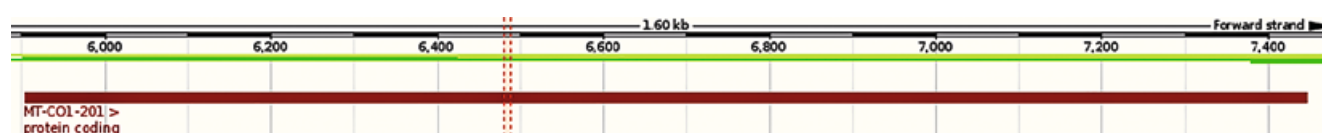


Рисунок 1. Расположение варианта 6479insAA в гене МТ-СОІ. Красным пунктиром отмечена локализация варианта.

парагиновой кислоты (рис. 2): валин имеет неполярный радикал и, соответственно, более гидрофобен; также его молекулярная масса меньше (117 г/моль, у аспартата — 133 г/моль).

Дыхательный комплекс I или НАДН-убихинон оксиредуктаза (также НАДН-дегидрогеназа) — первый белок дыхательной цепи переноса электронов. Комплекс играет центральную роль в процессе дыхания: именно он создает до 40% протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ. Действуя по принципу протонной помпы, НАДН-дегидрогеназа обладает уникальным механизмом транспорта протонов посредством конформационных изменений самого фермента. Комплекс окисляет одну молекулу НАДН и восстанавливает одну молекулу убихинона, при этом сквозь мембрану переносятся четыре протона [10].

Транспорт протонов происходит через три основных трансмембранных канала, образованных субъединицами ND2, ND4 и ND5, и через один дополнительный канал, образованный малыми субъединицами ND6, ND4L и ND3. Миссенс-замена в кластере ND4L, как одном из коровых элементов НАДН-дегидрогеназы, может серьезно влиять на общую функцию фермента.

Согласно базе OMIM мутации в ND4L приводят к развитию синдрома LHON (Лебера) и другим нейропатиям.

In silico инструменты оценки патогенности замены показали следующие результаты: PolyPhen — патогенный вариант (оценка 0,972); Provean — патогенный вариант (оценка –8,461); Sift — патогенный вариант (оценка 0,46).

Миссенс-вариант **C 12562G** был выявлен у обоих обследованных пациентов. Он приводит к несинонимичной замене лейцина на валин в 76-й позиции полипептидной цепи субъединицы ND5 респираторного комплекса I. Консервативность данного локуса составляет 80%. Лейцин и валин (рис. 3) схожи по своим физико-химическим свойствам: они являются гидрофобными нейтральными алифатическими аминокислотами с разветвленными боковыми цепями. Остатки этих аминокислот участвуют в гидрофобных взаимодействиях, которые поддержи-

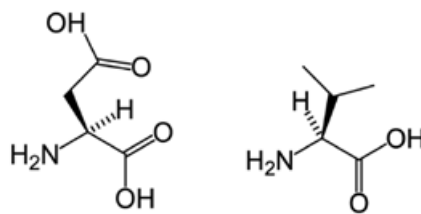


Рисунок 2. Структура аминокислот аспарагиновой кислоты (слева) и валина (справа).

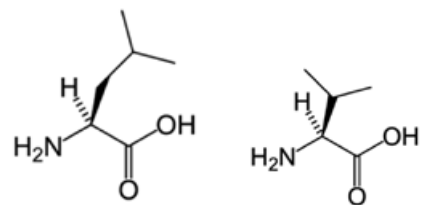


Рисунок 3. Структура аминокислот лейцина (слева) и валина (справа).

вают третичную структуру белка. Помимо такой общей структурной роли, они важны для связывания субстратов (НАДН и убихинона). Аминокислоты несколько различаются по молекулярной массе: 131 г/моль у лейцина и 117 г/моль у валина.

Кластер ND5 является лимитирующим в электронно-транспортной цепи НАДН-дегидрогеназы. Кроме того, ND5 вместе со своими антипорт-гомологами ND2 и ND4 образует три основных протонных канала, по которым происходит транспортировка протонов внутрь органеллы. При этом от С-конца ND5 отходят две трансмембранные спирали, которые физически связывают все три канала и, вероятно, участвуют в сопряжении транспорта электронов с конформационной перестройкой комплекса [4]. В связи с этим изменения в полипептидной последовательности субъединицы могут приводить к существенному ухудшению процесса дыхания.

Патогенные мутации в субъединице ND5 приводят к развитию таких синдромов, как MELAS, LHON, Ли, а также к недостаточности комплекса I [3]. Согласно базе данных OMIM, недостаточность комплекса I является наиболее распространенным дефектом при нарушении процессов оксидативного фосфорилирования. Согласно крупному исследованию более чем 100 семей [9] нарушения именно митохондриально-кодируе-

мых кластеров наиболее часто служат причиной развития недостаточности комплекса I у детей.

In silico инструменты для оценки потенциальной патогенности замены m.C 12562G показали следующие результаты: PolyPhen — патогенный вариант (оценка 0,996); Provean — непатогенный вариант (оценка –2,295); Sift — непатогенный вариант (оценка 0,31).

Отдельного внимания заслуживает тот факт, что данный вариант найден у обоих исследованных пациентов. Такое совпадение может иметь два наиболее вероятных объяснения: либо C 12562G является территориальным, гаплогрупповым полиморфизмом, либо он связан с некой общей фенотипической характеристикой пациентов. Поскольку гаплогруппы у пациентов относятся к совершенно разным ветвям филогенетического древа, вероятность связи исследуемого варианта с клинической картиной высока.

В результате делеции **11384delCTT**, выявленной у второго пациента, в субъединице ND4 НАДН-дегидрогеназы не синтезируется аминокислота лейцин в позиции 209. Кластер ND4 — это один из важнейших элементов фермента. Он является одним из четырех антипортов и участвует в создании протонного градиента [10]. В данном случае сдвига рамки считывания не происходит, а сама аминокислота находится в середине полипептидной цепочки. Подобные данные принято интерпретировать как не имеющие значения для развития болезни.

В табл. 4 приведена итоговая информация по выявленным у пациентов вариантам. У каждого из них обнаружены индивидуальные особенности митохондриальной ДНК, имеющие высокий патогенный потенциал.

Заключение

В обоих рассмотренных случаях не было выявлено классических клинически значимых мутаций митохондриальной ДНК. Однако были обнаружены новые и редкие варианты, связь которых с митохондриальными энцефаломиопатиями описана ранее не была. Из четырех выявленных вариантов три заслуживают дальнейшего изучения. Безусловно, полученные нами данные не могут служить осно-

Таблица 4

Информация о вероятной патогенности выявленных вариантов

	Вариант	Вероятность патогенности
Пациент 1	6479insAA	Высокая
	C 12562G	Высокая
Пациент 2	A10732T	Высокая
	11384delCTT	Низкая
	C 12562G	Высокая

Список литературы

1. Воронкова А. С., Литвинова Н. А., Сухоруков В. С., Николаева Е. А. Редкие варианты митохондриальной ДНК у ребенка с энцефаломиопатией. Российский вестник перинатологии и педиатрии 2016; 61 (5): 42–26.
2. Сухоруков В. С., Воронкова А. С., Литвинова Н. А. Клиническое значение индивидуальных особенностей митохондриальной ДНК. Российский вестник перинатологии и педиатрии 2015; 60 (2): 10–20.
3. Anderson S, Bankier AT, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 1981; 290 (5806): 457–465.
4. Baradaran R., Berrisford J. M., et al. Crystal structure of the entire respiratory complex I. Nature 2013; 494: 443–448.
5. Chinnery P., Hudson G. Mitochondrial genetics. Br Med Bull 2013; 106 (1): 135–159.
6. Ingman M., Kaessmann H., Pääbo S., et al. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. Nature 2000; 408: 708–713.
7. Marni J. Falk and Neal Sondheimer. Mitochondrial genetic diseases. Curr Opin Pediatr 2010; 22 (6): 711–716.
8. Schon E., DiMauro S., Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutation. Nat Rev Genet. 2012; 13 (12): 878–90.
9. Swalwell H, Kirby DM, et al. Respiratory chain complex I deficiency caused by mitochondrial DNA mutations. Eur J Hum Genet. 2011; 19 (7): 769–75.
10. Tsukihara T., Aoyama H., et al. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. Science 1996; 272 (5265): 1136–1144.
11. Wang J., Schmitt E., Megan L., et al. An integrated approach for classifying mitochondrial DNA variants: one clinical diagnostic laboratory's experience. Genetics in Medicine 2012; 14 (6): 620–626.
12. Zaragoza M., Brandon M., Diegoli M., et al. Mitochondrial cardiomyopathies: how to identify candidate pathogenic mutations by mitochondrial DNA sequencing, MITOMASTER and phylogeny. Eur J Hum Genet. 2011; 19 (2): 200–207.

ванием для окончательного диагноза, а все найденные варианты относятся к неклассифицированным. Для доказательства связи варианта с клиническим фенотипом требуются масштабные функциональные исследования, исследования независимых семей, исследования на цитоплазматических гибридах. Однако даже в случае, если за клинические фенотипы пациентов ответственны, к примеру, мутации в ядерном геноме, найденные нами индивидуальные особенности могут накладывать свой отпечаток на течение заболевания. Кроме того, описанный в статье подход ярко иллюстрирует необходимость: 1) секвенирования полного митохондриального генома для выявления индивидуальных особенностей митохондриальной ДНК; 2) максимально точного определения гаплогруппы пациента; 3) биоинформатического исследования различных характеристик выявленных вариантов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-08416.



БИОСЕНСОР АН

ОТЕЧЕСТВЕННОЕ ПРОИЗВОДСТВО БИОХИМИЧЕСКИХ
ТЕСТ-ПОЛОСОК



(49652) 28-190, 28-490, 28-489

www.biosensoran.ru, www.diatest.ru,
www.express-diagnostics.ru

УНИКАЛЬНАЯ ЛИНЕЙКА АВТОМАТИЧЕСКИХ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СИСТЕМ СЕРИИ VIDAS – ОПТИМАЛЬНОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ ЛЮБОЙ ЛАБОРАТОРИИ



Vidas

Создан для вас

- ✓ Все необходимые для анализа реактивы включены в набор
- ✓ Стрипы с готовыми реактивами рассчитаны на один образец (1 пациент = 1 тест)
- ✓ Не затратный по времени и простой процесс калибровки
- ✓ Простой и понятный пользовательский интерфейс: просто загрузите стрипы – остальное система сделает за вас
- ✓ Секции прибора полностью независимы, в разные секции можно устанавливать любые сочетания тестов и начинать анализ в разное время
- ✓ Анализатор доступен 24 часа в сутки и позволяет провести исследование небольшой партии образцов за короткое время без дополнительных временных затрат
- ✓ Широкий выбор тестов (около 100 иммунохимических параметров)



121108, Москва,
ул. Ивана Франко, 4, к.1
Бизнес центр «Кунцево»
Тел.: +7 (495) 380 36 01
www.delrus.ru



Диагностика острого панкреатита с позиций доказательной медицины

Л. А. Беганская, аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики
А. А. Кишкун, д. м. н. медицинский директор ООО «Адвенсум»

Кафедра клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования» Минздрава России, г. Москва

Diagnosis of acute pancreatitis from standpoint of evidence-based medicine

L. A. Beganskaya, A. A. Kishkun

Russian Medical Academy for Postgraduate Continuous Education, Moscow, Russia



Л. А. Беганская



А. А. Кишкун

Резюме

Методы лабораторной диагностики играют ведущую роль в этиологической диагностике, установлении этиологии, определении тяжести течения и прогноза острого панкреатита. В исследовании представлен анализ возможностей современных методов лабораторной диагностики в отношении клинической практики в соответствии с принципами доказательной медицины, продемонстрированы взаимосвязь их возможностей, стратегия и последовательность применения, их эффективность в каждой конкретной клинической ситуации.

Ключевые слова: острый панкреатит, методы лабораторной диагностики, доказательная медицина.

Summary

Methods of laboratory diagnostics play a leading role in the etiological diagnosis, determining etiology, determining the severity and prognosis of acute pancreatitis. The study presents an analysis of the capabilities of modern methods of laboratory diagnostics in clinical practice, in accordance with the principles of evidence-based medicine, demonstrated the relationship of their capabilities, strategy and consistency in the application, their performance in each specific clinical situation.

Key words: acute pancreatitis, methods of laboratory diagnostics, evidence-based medicine.

Острый панкреатит (ОП) — одно из самых распространенных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Согласно эпидемиологическим данным заболеваемость ОП варьирует по всему миру от 4,9 до 73,4 случая на 100 тысяч человек [1, 2]. За последние 10–15 лет количество больных острым панкреатитом увеличилось в 2–3 раза. Это связано с ростом потребления населением алкоголя, что является одной из основных причин развития этого заболевания. Исследования, проведенные Р. J. Fagenholz и соавт. (2007), показали, что с 1988-го по 2003 год поступление пациентов с ОП в стационар выросло с 40 случаев в 1998 году до 70 на 100 тысяч человек в 2002-м. В России ОП занимает третье место в структуре острых хирургических заболеваний органов брюшной полости после острого аппендицита и острого холецистита, составляя 9,0–12,5 % от частоты urgentных заболеваний органов брюшной полости (от 235 до 331 на 1 миллион жителей) [3, 4].

Клиническое течение острого панкреатита вариативно. Острый панкреатит легкого течения или

так называемый интерстициальный (отечный) панкреатит проходит при проведении медикаментозного лечения через несколько дней или неделю без отдаленных последствий. В случае тяжелого течения острый панкреатит (некротический панкреатит) представляет собой состояние, угрожающее жизни больного. В связи с этим роль лабораторных методов исследования имеет важное, а в ряде случаев решающее значение (например, при остром послеоперационном панкреатите, когда патологический процесс в поджелудочной железе «прикрыт» клиническими проявлениями послеоперационной болезни). Диагностика острого панкреатита сложна, ошибки на догоспитальном этапе составляют 48,3 %, в приемном отделении — 21,7 % и в стационаре при поступлении — 14,7 % [5]. Традиционные клиничко-лабораторные и даже инструментальные признаки острого панкреатита часто не дают возможности достоверно различить форму острого панкреатита в течение первых 24 и даже 48 часов от начала заболевания. По данным ряда исследователей, у 67 % больных панкре-

атите некрозом в течение первых суток от начала заболевания предполагался отечный панкреатит [6].

Установление этиологии ОП имеет важное значение в выборе методов лечения заболевания. Наиболее частыми причинами ОП являются камни в желчном пузыре (40–70 %) и злоупотребление алкоголем (25–35 %) [7, 8]. Злоупотреблением алкоголя считается уровень его потребления более 50 г в день [9]. В целом на эти две группы причин приходится около 80 % всех случаев острого панкреатита. Остальные 20 % составляют другие причины: травмы живота, прием лекарственных препаратов, эндокринные заболевания и генетические факторы [3].

При ведении пациентов с ОП врачи-клиницисты испытывают значительные трудности в определении тяжести течения и прогноза заболевания. Существующие системы и шкалы оценки прогноза ОП громоздки, имеют ограниченное значение в первые 24–48 часов от начала заболевания и могут приводить к задержке необходимого лечения [10].

Таким образом, диагностика, установление тяжести течения и прогноза

Таблица 1
GRADE-система качества доказательств и силы рекомендации

Качество доказательств	Сила рекомендации
Высокое	Дальнейшие исследования вряд ли изменят уверенность в оценке эффекта
Умеренное	Дальнейшие исследования, вероятно, окажут значительное влияние на уверенность в оценке эффекта и смогут изменить оценку
Низкое	Дальнейшие исследования, весьма вероятно, окажут важное влияние на уверенность в оценке эффекта и, вероятно, изменят оценку
Очень низкое	Любая оценка эффекта является весьма неопределенной

большого ОП представляют нелегкую проблему. При практическом решении этих задач необходимо опираться на данные международных клинических рекомендаций по лечению больных ОП. С позиций доказательной медицины, врач клинической лабораторной диагностики и врач-клиницист должны иметь представления о научно обоснованных критериях постановки диагноза, определения прогноза, целей и методах лечения. Главная идея доказательной медицины очень проста: применение на практике только тех методов диагностики и лечения, эффективность которых доказана на основе строгих научных принципов в результате клинических исследований. Поэтому основной целью нашего исследования является необходимость ознакомить специалистов различных медицинских лабораторий и врачей-клиницистов с возможностями современных лабораторных технологий в отношении диагностики ОП и дать рекомендации по их использованию с позиций доказательной медицины.

Материалы исследования, уровни, сила и качество доказательств

В основу работы положен анализ данных следующих клинических рекомендаций по лечению ОП:

1. Американского колледжа гастроэнтерологии: Лечение острого панкреатита (2013) [11];
2. Международной ассоциации панкреатологов в сотрудничестве с Американской ассоциацией поджелудочной железы [12];
3. японские рекомендации по лечению острого панкреатита: японские рекомендации (2015) [13].

Целью анализа было определение роли лабораторных исследований с позиции доказательной медицины в отношении таких проблем, как диагностика ОП и установление его этиологии, определение тяжести заболевания и прогноза.

Все важнейшие диагностические мероприятия в данных клинических рекомендациях разделены по степени доказательности в зависимости от имеющихся данных клинических рандомизированных исследований.

В клинических рекомендациях Американского колледжа гастроэнтерологии 2013 года в основу отнесения диагностических мероприятий были положены критерии системы Grades of Recommendation, Assessment, Development and Evaluation (GRADE). Соотношение качества доказательств и силы рекомендаций (сильные и варьируемые) представлено в табл. 1.

Клинические рекомендации Международной ассоциации панкреатологов в сотрудничестве с Американской ассоциацией поджелудочной железы ранжируют все мероприятия при ведении больных ОП по качеству доказательности на следующие уровни:

- высокий — уровень А;
- средний — уровень В;
- низкий — уровень С;
- очень низкий — уровень D.

Помимо этого, они разделяют силу доказательности рекомендуемых диагностических мероприятий на два класса:

- обязательные (сильные) — класс 1;
- необязательные (варируемые) — класс 2.

Соответственно, сила и качество доказательности рекомендации соотносятся следующим образом:

- 1А — сильная рекомендация, высокое качество доказательств;
- 1В — сильная рекомендация, умеренное качество доказательств;
- 1С — сильная рекомендация, низкое качество доказательств;
- 2В — слабая рекомендация, умеренное качество доказательств;
- 2С — слабая рекомендация, низкое качество доказательств.

Аналогичным образом ранжируют по силе и качеству доказательств диагностические мероприятия при ОП японские рекомендации по лечению острого панкреатита 2015 года.

Критерии диагностики ОП

Процесс установления диагноза у больного ОП несовершенен: врач-клиницист может лишь предполагать, что диагноз верен, нежели утверждать это со всей определенностью. Поэтому очень важно знать критерии, которые позволяют с высокой надежностью диагностировать заболевание. Все представленные выше клинические рекомендации констатируют, что диагноз ОП считается установленным при наличии 2 из 3 критериев:

1. боль в эпигастральной области или левом верхнем квадранте живота с радиацией в область спины, обычно сильной или переменной интенсивности;
2. активность сывороточной амилазы и (или) липазы, в три и более раза превышающая верхний предел референтного интервала;
3. характерные результаты лучевых методов исследования брюшной полости.

Клинические рекомендации Американского колледжа гастроэнтерологии 2013 года оценивают использование данных критериев для диагностики ОП как сильная рекомендация и умеренное качество доказательств. Одновременно в рекомендациях констатируется, что из-за ограниченной чувствительности, специфичности, прогностической ценности положительного и отрицательного результата исследование только сывороточной амилазы не может быть использовано для надежной диагностики ОП, и определение активности липазы сыворотки крови является предпочтительным.

Таблица 2
Сила и качество доказательств

Диагностика	Сила и качество доказательств
Диагноз устанавливают при наличии 2 из 3 критериев: 1. острая боль вверху живота; 2. повышение уровня сывороточной амилазы и (или) липазы в три раза выше верхней границы нормы и (или) 3. характерные признаки в результатах КТ брюшной полости	1B
Использование КТ КТ брюшной полости должна выполняться, если: 1. диагноз неясен или 2. в состоянии пациента не отмечается клинического улучшения в течение 3–5 дней	1B

Амилаза сыворотки у пациентов ОП, как правило, повышается в течение нескольких часов после появления клинических симптомов и возвращается к нормальным значениям в течение 3–5 суток, однако она может оставаться в пределах референтных величин у 1 из 5 больных при их поступлении в лечебное учреждение. Активность сывороточной амилазы быстрее возвращается в пределы референтных значений по сравнению с липазой. Кроме того, активность сывороточной амилазы может быть в норме при алкогольном ОП и при наличии у пациента гипертриглицеридемии. Активность сывороточной амилазы может быть повышенной при отсутствии ОП вследствие макроамилаземии (синдром, характеризующийся формированием крупных молекулярных комплексов между амилазой и патологическими иммуноглобулинами), у пациентов со сниженной скоростью клубочковой фильтрации, при заболеваниях слюнных желез и при внепанкреатических заболеваниях органов брюшной полости, в том числе при остром аппендиците, холецистите, кишечной непроходимости или ишемии, язвенной болезни, гинекологических заболеваниях.

Активность липазы сыворотки крови при ОП повышается более значительно и остается повышенной дольше, чем амилаза. Несмотря на преимущество исследования липазы сыворотки крови, проблемы с прогностической ценностью положительных результатов анализов этого фермента имеют место в определенных группах пациентов, в том числе вследствие наличия синдрома макроамилаземии. Липаза может также повышаться при различных непанкреатических заболеваниях,

таких как болезни почек, острый аппендицит и холецистит. Кроме того, у больных сахарным диабетом в качестве верхнего предела нормальных значений активности липазы необходимо рассматривать величины в 3–5 раз выше тех, которые используются в отношении практически здоровых людей, по неясным причинам [14]. Вместе с тем в клинических рекомендациях отмечается, что, не смотря на эффективность использования для диагностики ОП значений активности сывороточной амилазы и (или) липазы, в три и более раз превышающих верхний предел референтного интервала, врачи должны учитывать клиническое состояние пациента при оценке величин повышения амилазы и липазы. Если возникают сомнения в отношении величин активности амилазы и (или) липазы, для диагностики ОП рекомендуется использовать компьютерную томографию брюшной полости с контрастированием.

В клинических рекомендациях Американского колледжа гастроэнтерологии 2013 года указывается, что компьютерная томография (КТ) с контрастированием и (или) магнитно-резонансная томография (МРТ) поджелудочной железы должна быть проведена пациентам, у которых диагноз остается неясным или при отсутствии клинического улучшения состояния пациента в течение первых 48–72 часов после госпитализации, или для выявления осложнений (сильная рекомендация, низкое качество доказательств).

Сила и качество доказательств для диагностики ОП, изложенные в клинических рекомендациях Международной ассоциации панкреатологов в сотрудничестве с Американской ассоциацией поджелудочной железы, приведены в табл. 2.

В японских рекомендациях по лечению острого панкреатита 2015 года диагностика ОП базируется на критериях, которые полностью совпадают с приведенными выше (при наличии 2 из 3 критериев):

1. острые боли в животе и болезненность в верхней части живота при пальпации;
2. повышение активности панкреатических ферментов в крови или моче;
3. аномальные изменения, обнаруженные с помощью УЗИ, КТ или МРТ, характерные для ОП.

Вместе с тем японские рекомендации по лечению острого панкреатита 2015 года содержат ряд полезных для клинической практики уточнений в отношении исследования активности панкреатических ферментов для диагностики ОП. Констатируется, что обнаружение повышенного уровня в крови ферментов поджелудочной железы имеет решающее значение в диагностике ОП, а в клинических случаях, когда ОП необходимо дифференцировать с другими заболеваниями, исследование активности липазы сыворотки крови превосходит любые другие панкреатические ферменты, в том числе амилазу. Поэтому определение активности амилазы сыворотки крови для диагностики ОП рекомендуется только в тех случаях, когда измерение липазы невозможно (1B — сильная рекомендация, умеренное качество доказательств).

Качественное определение трипсиногена-2 в моче может быть полезно в качестве минимально инвазивного метода экспресс-диагностики ОП (неопределенная сила рекомендации, умеренное качество доказательств — В). Диагностика ОП с помощью исследования трипсиногена-2

в моче является весьма эффективным методом в медицинских учреждениях, где исследование ферментов крови не может быть проведено, так как для получения результата теста требуется очень короткое время (5 минут), он обладает высокими диагностическими способностями и является эквивалентом ферментов поджелудочной железы в сыворотке крови.

Трипсин синтезируется ацинарными клетками поджелудочной железы и выделяется в панкреатический сок в качестве профермента трипсиногена. Трипсиногены составляют более 19% всех белков панкреатического сока. Трипсиноген существует в двух главных изоформах: трипсиноген-1 и трипсиноген-2. При повреждении поджелудочной железы трипсиноген попадает в кровоток, а затем фильтруется почками в мочу. Трипсиноген-2 выделяется в мочу в значительных количествах уже на ранней стадии ОП и остается повышенным в течение нескольких дней и даже недель после клинических проявлений заболевания. Исследование трипсиногена-2 в моче обеспечивает надежный и быстрый скрининг ОП: отрицательный результат исключает наличие заболевания с точностью 99% [15].

Этиологическая диагностика ОП

Установление этиологии ОП имеет важное значение для выбора метода и тактики лечения пациентов, а также для предотвращения рецидивов. В клинических рекомендациях Американского колледжа гастроэнтерологии 2013 года констатируется:

1. трансабдоминальное ультразвуковое исследование (УЗИ) должно быть проведено всем пациентам с ОП (сильная рекомендация, низкое качество доказательств);
2. при отсутствии камней в желчном пузыре (данные УЗИ) и (или) продолжительной истории злоупотребления алкоголем должно быть проведено исследование триглицеридов в сыворотке крови; значения выше 1000 мг/дл (11,3 ммоль/л) указывают на алкогольную этиологию ОП (условная рекомендация, умеренное качество доказательств);

3. у пациентов старше 40 лет наличие опухоли поджелудочной железы должно быть рассмотрено в качестве возможной причины ОП (условная рекомендация, низкое качество доказательств);
4. эндоскопическое исследование для установления этиологии у пациентов с ОП должно быть ограничено, так как риски и выгоды от исследования у этих пациентов неясны (условно рекомендация, низкое качество доказательств);
5. пациенты с идиопатическим ОП должны быть направлены в специализированные центры для обследования (условная рекомендация, низкое качество доказательств); диагноз «идиопатический панкреатит» выставляется тем пациентам, у которых причину ОП установить не удастся;
6. генетическое тестирование может быть рассмотрено у пациентов молодого возраста (до 30 лет), если причина ОП не установлена и в семейном анамнезе встречались заболевания поджелудочной железы (условная рекомендация, низкое качество доказательств).

В отсутствие злоупотребления алкоголем и желчнокаменной болезни в качестве причин ОП врачу-клиницисту следует соблюдать осторожность при установлении возможной этиологии заболевания. Лекарственные средства, инфекционные агенты, а также метаболические факторы, такие как гиперкальциемия и гиперпаратиреоз, часто выступают в качестве ложных этиологических причин ОП. Несмотря на то что некоторые лекарственные препараты, такие как 6-меркаптопурин, азатиоприн, и 2',3'-дидеоксинозин могут приводить к ОП, в литературе представлены ограниченные данные о роли лекарственных средств в качестве этиологических факторов заболевания. Первичная и вторичная гипертриглицеридемия могут способствовать развитию ОП; однако на эти причины приходится лишь 1–4% случаев ОП [16]. Молочная сыворотка наблюдается у 20% от пациентов с ОП, тем не менее уровень триглицеридов в сыворотке крови должен быть выше 1000 мг/дл (11,3 ммоль/л), чтобы считаться причиной ОП.

Установлено, что у 5–14% больных с доброкачественными или злокачественными опухолями органов панкреатобилиарной зоны диагностируется идиопатический ОП. Поэтому у любого пациента старше 40 лет с идиопатическим панкреатитом, особенно с длительным или рецидивирующим течением, следует заподозрить наличие опухоли.

Влияние генетических мутаций, таких как мутации гена катионного трипсиногена (PRSS 1), серин-проteaseзного ингибитора Казала (SPINK 1) или трансмембранного регулятора кистозного фиброза (CFTR), все чаще рассматривается в качестве этиологических причин ОП. Однако роль генетического тестирования в установлении причин ОП еще не может быть определена с позиций доказательной медицины вследствие отсутствия достаточных доказательств. Тем не менее генетические исследования могут быть полезны у пациентов с наличием заболевания поджелудочной железы у более чем одного члена семьи.

Клинические рекомендации Международной ассоциации панкреатологов в сотрудничестве с Американской ассоциацией поджелудочной железы указывают на необходимость проведения лабораторных тестов для оценки функции печени у пациентов с ОП, особенно определение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ). Активность АЛТ выше 150 МЕ/л имеет 95-процентное положительное прогностическое значение для диагностики желчнокаменного панкреатита.

У всех пациентов с ОП этиология должна быть установлена на основании анализа особенностей истории болезни, результатов лабораторных анализов (функциональные пробы печени, содержание в сыворотке крови триглицеридов, кальция) и заключения по данным трансабдоминального УЗИ (1В — сильная рекомендация, умеренное качество доказательств).

В японских рекомендациях по лечению острого панкреатита 2015 года констатируется, что этиологическая диагностика желчнокаменного панкреатита является наиболее важной и актуальной проблемой, так как она оказывает значительное влияние

Таблица 3
Определения степени тяжести ОП: сравнение критериев Атланты — 1993 и пересмотренных в 2013 году

Критерии 1993 года	Пересмотренные критерии 2013 года
Умеренный острый панкреатит: отсутствие полиорганной недостаточности отсутствие местных осложнений	Умеренный острый панкреатит: 1. отсутствие полиорганной недостаточности 2. отсутствие местных осложнений
Тяжелый острый панкреатит: 1. местные осложнения и (или) 2. органная недостаточность: • желудочно-кишечное кровотечение (> 500 мл за 24 часа) • шок: систолическое АД ≤ 90 мм рт. ст. • pO ₂ ≤ 60% • креатинин ≥ 2 мг/дл (≥ 176,8 мкмоль/л)	Умеренно тяжелый острый панкреатит: 1. местные осложнения и (или) 2. транзиторная органная недостаточность (< 48 часов)
	Тяжелый острый панкреатит: 1. Персистирующая органная недостаточность (> 48 часов)

на выбор правильного метода лечения. Определение уровня билирубина, активности АЛТ, аспартатаминотрансферазы (АСТ) и щелочной фосфатазы показано всем пациентам при подозрении на желчнокаменный панкреатит.

Оценка степени тяжести ОП

Степень тяжести течения ОП является важным показателем смертности и играет важнейшую роль в определении тактики правильного ведения при первоначальном поступлении больного, в необходимости перевода его в отделение реанимации. Адекватная оценка степени тяжести пациента на момент диагностики ОП повышает вероятность правильного лечения и улучшает прогноз. В японских рекомендациях по лечению острого панкреатита 2015 года указывается на необходимость провести оценку степени тяжести пациента немедленно после установления диагноза и повторять с течением времени, особенно в течение 48 часов (1С — сильная рекомендация, низкое качество доказательств).

В клинических рекомендациях Американского колледжа гастроэнтерологии 2013 года констатируется:

1. оценка степени тяжести ОП должна быть выполнена для стратификации пациентов и оказания помощи в сортировке (условная рекомендация, качество доказательств от низкого до умеренного);
2. пациенты с полиорганной недостаточностью должны быть переведены в отделение реанимации (сильная рекомендация, низкое качество доказательств).

Во всех анализируемых рекомендациях для оценки тяжести ОП указывается на необходимость использовать модифицированные критерии, принятые на Международном симпозиуме в Атланте (2013) [17].

Клиническое течение ОП вариабельно. Умеренный ОП проходит при проведении медикаментозного лечения через несколько дней или неделю без отдаленных последствий. В случае тяжелого течения ОП представляет собой состояние, угрожающее жизни больного и характеризуется наличием постоянных (не удается устранить в течение 48 часов) признаков полиорганной недостаточности. При этом самопереваривание поджелудочной железы ее активированными ферментами вызывает распространенные некрозы, воспаление и кровоизлияния не только в поджелудочной железе, но и в окружающих органах (кишечник, большой сальник, забрюшинное пространство). У таких больных часто развиваются шок и тяжелая гипотензия. Осложнениями тяжелого панкреатита являются сердечная и дыхательная недостаточность, желтуха, анемия, гипокалиемия, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови и сепсис с полиорганной недостаточностью. Умеренный ОП составляет около 80 % всех случаев заболевания, смертность низкая: от 1 до 3 %. В то время как при тяжелом (некротическом) панкреатите (20 % случаев) смертность составляет от 10 до 30 %, особенно если течение панкреонекроза осложнилось инфекцией [18]. Умеренно тяжелый ОП характеризуется наличием транзиторной недостаточности органа, местного

или системного осложнения при отсутствии стойких признаков органной недостаточности. Для пациентов с умеренно тяжелым ОП характерны наличие перипанкреатической жидкости, продолжительные боли в области живота, лейкоцитоз и лихорадка.

Полиорганная недостаточность ранее (Атланта — 1993) определялась на основании следующих признаков: шок (систолическое артериальное давление ниже 90 мм рт. ст.);

- легочная недостаточность (pO₂ ниже 60 %);
- почечная недостаточность (креатинин выше 2 мг/дл после регидратации), и (или)
- желудочно-кишечное кровотечение (более 500 мл кровопотери за 24 часа).

Пересмотренные критерии (Атланта — 2013) определяют полиорганную недостаточность как результат недостаточности двух или более органов и систем, оцененных с помощью модифицированной шкалы Маршалла [19]. Вместе с тем в клинических рекомендациях Американского колледжа гастроэнтерологии 2013 года указывается на то, что диагностика полиорганной недостаточности с использованием модифицированной шкалы Маршалла требует проведения дополнительных расчетов, что вызывает у врачей определенные сложности. Поэтому использование старых критериев полиорганной недостаточности по-прежнему является полезным в клинической практике, и необходимы дальнейшие исследования для подтверждения клинической эффективности

шкалы Маршалла. Панкреонекроз определяется как выявление диффузной или очаговой зоны нежизнеспособной паренхимы поджелудочной железы более 3 см или более 30 % поджелудочной железы [20].

В японских рекомендациях по лечению острого панкреатита 2015 года приведена система оценки степени тяжести ОП, утвержденная Министерством здравоохранения, труда и благосостояния Японии (2008) в качестве стандарта. Использование данного стандарта определено как сильная рекомендация с умеренным качеством доказательств (1В).

Японская шкала оценки степени тяжести ОП

(1 балл за каждый фактор)

1. дефицит оснований ниже 3 ммоль/л или шок (систолическое артериальное давление ниже 80 мм рт. ст.);
2. pO_2 ниже 60 % или легочная недостаточность (требуется респираторная поддержка);
3. мочевины выше 40 мг/дл (более 14,28 ммоль/л) или креатинин выше 2,0 мг/дл (более 176,8 мкмоль/л), или олигурия (суточный диурез менее 400 мл даже после инфузионной терапии);
4. лактатдегидрогеназа выше в два раза от верхней границы нормы;
5. количество тромбоцитов менее $100,0 \times 10^9/л$;
6. общий кальций в сыворотке ниже 7,5 мг/дл (менее 1,875 ммоль/л);
7. С-реактивный белок выше 15 мг/дл (более 150 мг/л);
8. число положительных критериев ССВО более трех;
9. возраст более 70 лет.

Критерии синдрома системного воспалительного ответа (ССВО):

- температура тела выше 38 °С или ниже 36 °С;
- число сердечных сокращений более 90 уд. в минуту;
- число дыханий более 20 в минуту или pCO_2 ниже 32 мм рт. ст., или искусственная вентиляция легких;
- число лейкоцитов выше $12 \times 10^9/л$ или ниже $4 \times 10^9/л$;
- незрелых форм лейкоцитов более 10 %.

Данные КТ с контрастированием:

1. Внепанкреатическое прогрессирование воспаления:
 - переднее паранефральное пространство — 0 баллов;
 - корень брыжейки ободочной кишки — 1 балл;
 - за пределы нижнего полюса почки — 2 балла.
1. Снижение плотности поджелудочной железы (поджелудочная железа делится на три сегмента: головка, тело, хвост);
 - локализованное в каждом сегменте или только окружающие ткани поджелудочной железы — 0 баллов;
 - охватывает два сегмента — 1 балл;
 - занимает целиком два или более сегмента — 2 балла.

1 + 2 = Общий балл для результатов КТ:

Общая оценка = 0 или 1 балл — первый класс;

Общая оценка = 2 балла — второй класс;

Общая оценка = 3 балла или больше — третий класс.

Оценка степени тяжести ОП

Если прогностические факторы набрали 3 балла или больше, или класс КТ оценивается как второй класс и более, то ОП оценивается как тяжелый.

Прогноз ОП

Очень важной для выбора правильной тактики ведения пациентов с ОП является объективная оценка его тяжести и, соответственно, прогноза заболевания. Тяжесть заболевания в целом отражает характер и степень деструкции поджелудочной железы. Чем обширнее и глубже некротический процесс, тем тяжелее острота клинических проявлений заболевания и тем вероятнее развитие системных и гнойных осложнений. Во всех анализируемых клинических рекомендациях указывается на то, что для оценки прогноза лечения ОП в клинической практике применяют два подхода. Первый основан на использовании различных комплексных шкал, второй — отдельных лабораторных показателей.

Наиболее широкое применение в клинике нашли шкалы по Рэнсону (табл. 4) и APACHE-II [3]. Главными недостатками шкал для определения прогноза исхода ОП являются следующие:

- необходимость в течение 24–48 часов исследовать различные параметры;
- очень широкий спектр параметров и сложность их комплексной оценки;
- отсутствие морфологических критериев острого панкреатита.

Новые шкалы определения тяжести и прогноза ОП, такие как шкала Маршалла, не позволили сделать прогноз исхода заболевания более точным.

В рекомендациях Американского колледжа гастроэнтерологии 2013 года указывается на то, что целый ряд лабораторных показателей могут оказать помощь врачу-клиницисту в определении тяжести ОП. Однако среди всех существующих лабораторных исследований отсутствуют тесты, обладающие высокой прогностической точностью. Даже наиболее изученный среди острофазовых маркеров воспаления С-реактивный белок (СРБ) имеет ограниченное значение, так как позволяет правильно оценивать прогноз ОП только спустя 72 часа после поступления больного. Поэтому в настоящее время врачи-клиницисты не в состоянии предсказать, у каких пациентов с ОП разовьется тяжелое заболевание.

Вместе с тем независимо от недостатков, присущих современным шкалам оценки прогноза ОП, врачи-клиницисты должны быть ознакомлены с факторами риска, включая лабораторные показатели, развития тяжелого ОП.

Клинические и лабораторные факторы риска

1. Характеристики пациента:

- возраст более 55 лет;
- ожирение: индекс массы тела выше 30 кг/м²;
- нарушения психического статуса;
- наличие сопутствующих заболеваний.

2. Признаки ССВО (число положительных критериев — три и более).

Таблица 4
Критерии тяжелого острого панкреатита [21]

Показатель	Алкогольный	Билиарный
При поступлении:		
• возраст больного, лет	> 55	> 70
• количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л	> 16,0	> 20,0
• глюкоза сыворотки, ммоль/л	> 11,1	> 12,2
• ЛДГ сыворотки, МЕ/л	> 700	> 400
• АСТ сыворотки, МЕ/л	> 250	> 250
В течение первых 48 часов после госпитализации:		
• снижение гематокрита, %	> 10	> 10
• повышение мочевины сыворотки, ммоль/л	> 16	> 8
• общий кальций сыворотки, ммоль/л	< 2,0	< 2,0
• рО ₂ артериальной крови, мм рт. ст.	< 60,0	–
• дефицит оснований, ммоль/л	> 4	> 5
• расчетная потеря (секвестрация жидкости), л	> 6	> 4

Признаком тяжелого острого панкреатита по шкале Рэнсона является наличие трех и более критериев.

3. Лабораторные признаки:

- мочевины более 20 мг/дл (7,14 ммоль/л);
- нарастающий уровень мочевины;
- гематокрит более 44 %;
- нарастающие величины гематокрита;
- повышенный уровень креатинина.

Обилие шкал и показателей для оценки прогноза ОП свидетельствует о том, что все они имеют те или иные недостатки, которые заставляют вести дальнейший научный поиск с целью их совершенствования.

Обсуждение рекомендаций

Каждое клиническое решение, в том числе и назначение лабораторных исследований больному, должно основываться на строго доказанных научных фактах. За последние годы международными сообществами врачей разработаны научно обоснованные критерии диагностики заболеваний и выбора адекватной тактики ведения больного в каждой конкретной клинической ситуации, где целому ряду лабораторных показателей отдается приоритетное значение. Знание этих критериев и их использование в повседневной клинической практике является обязательным требованием доказательной медицины.

При оказании медицинской помощи врач-клиницист постоянно сталкивается с ситуацией, когда диагноз на основании осмотра больного и физикально-анамнестических данных трудно установить или есть необходи-

мость в проведении дифференциальной диагностики нескольких заболеваний и, соответственно, назначении пациенту дополнительных диагностических тестов. В таких ситуациях в рамках доказательной медицины для оптимального выбора лабораторных тестов врачу-клиницисту необходима дополнительная информация о том, насколько точно эти тесты способны выявлять предполагаемое заболевание. Такую дополнительную информацию предоставляют данные клинических рекомендаций международных врачебных ассоциаций.

Важнейшим достоинством клинических рекомендаций является то, что они дают характеристику степени эффективности используемых методов диагностики ОП, установления его этиологии, определения степени тяжести и прогноза, основанную на результатах многоцентровых контролируемых исследований.

В анализируемых клинических рекомендациях констатируется, что обнаружение повышенного уровня в крови ферментов поджелудочной железы имеет решающее значение в диагностике ОП. Однако уточняется, что исследование только сывороточной амилазы не может быть использовано для надежной диагностики ОП, и определение активности липазы сыворотки крови является предпочтительным.

Приведенные данные клинических рекомендаций различных врачебных ассоциаций по проблемам диагностики, установления этиологии, оценки

тяжести и прогноза ОП показывают, что если ориентироваться на данные только одних рекомендаций, то невозможно получить всю необходимую и важную информацию для комплексного решения практических задач при ведении больных. Так, в рекомендациях Американского колледжа гастроэнтерологии 2013 года и Международной ассоциации панкреатологов в сотрудничестве с Американской ассоциацией поджелудочной железы отсутствует информация по проблеме диагностики ОП в лечебных учреждениях, где нет лаборатории, но такая информация содержится в японских рекомендациях по лечению острого панкреатита 2015 года. В них констатируется, что диагностика ОП с помощью исследования трипсиногена-2 в моче является весьма эффективным методом в медицинских учреждениях, где анализ крови не может быть выполнен.

Такие же полезные дополнения имеются и в отношении роли лабораторных исследований в установлении этиологии ОП. Клинические рекомендации Международной ассоциации панкреатологов в сотрудничестве с Американской ассоциацией поджелудочной железы указывают на необходимость проведения лабораторных тестов для оценки функции печени у пациентов с ОП, особенно АЛТ. В свою очередь, японские рекомендации по лечению острого панкреатита 2015 года однозначно говорят о том, что определение уровня билирубина, АЛТ, АСТ и щелочной

фосфатазы показано всем пациентам при подозрении на желчнокаменный панкреатит.

Аналогичным образом приведенные рекомендации дополняют друг друга и в отношении определения тяжести и прогноза ОП. В этом плане определенный интерес представляет японская шкала оценки степени тяжести ОП, основой которой служат результаты лабораторных исследований.

В настоящее время клиническая практика остро нуждается в объективных критериях оценки тяжести состояния больных ОП. Большинство исследователей признают, что наиболее целесообразно количественное выражение тяжести состояния пациента, которое позволяет более точно прогнозировать исход заболевания, дать динамическую оценку эффективности проводимой терапии, выбрать новые методы и направления в тактике ведения больных, а также рационально использовать имеющиеся экономические ресурсы. Все анализируемые клинические рекомендации содержат информацию о том, что ни один из изученных лабораторных тестов, включая СРБ, не обладает высокой прогностической точностью. Это не значит, что в клинической и лабораторной практике необходимо отказаться от исследований СРБ, прокальцитонина, пресептина и других тестов для оценки тяжести больных ОП, прогноза, выявления гнойных осложнений заболевания. Рекомендации лишь отражают тот факт, что на данный момент результатов проведенных исследований еще недостаточно, чтобы дать конкретные рекомендации по этим тестам с позиций доказательной медицины. Необходимо понимать, что клинические рекомендации — это систематически обновляемые положения, созданные для того, чтобы помочь врачу в принятии решений относительно врачебной тактики в определенных клинических ситуациях, но они систематически обновляются в соответствии с полученными новыми данными многоцентровых исследований по проверке эффективности новых методов диагностики и лечения. Поэтому по мере накопления научных данных о клинической эффективности тех или иных лабора-

торных тестов в отношении решения определенных практических задач они будут внесены в рекомендации.

Заключение

Основными целями нашего исследования была необходимость ознакомить специалистов различных медицинских лабораторий и врачей-клиницистов с возможностями современных лабораторных технологий в отношении диагностики ОП и дать рекомендации по их использованию с позиций доказательной медицины.

С позиций доказательной медицины врач клинической лабораторной диагностики и врач-клиницист должны иметь представления о научно обоснованных критериях постановки диагноза, определения степени тяжести и прогноза.

Представленный анализ роли лабораторных методов исследования клинических рекомендаций международных врачебных ассоциаций при ведении больных ОП не только характеризует возможности методов лабораторной диагностики в отношении клинической практики, но и в соответствии с принципами доказательной медицины демонстрирует взаимосвязь их возможностей, стратегию и последовательность применения, эффективность в каждой конкретной клинической ситуации.

Список литературы

1. Fagenholz P.J., Castillo C.F., Harris N.S. et al. Increasing United States hospital admissions for acute pancreatitis, 1988–2003 // *Ann. Epidemiol.* — 2007. — Vol. 17. — P. 491–7.
2. Yadav D., Lowenfels A.B. Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systemic review // *Pancreas.* — 2006. — Vol. 33. — P. 323–30.
3. Кишкун А.А. Лабораторная диагностика неотложных состояний. — М.: Лабора, 2012. — 816 с.
4. Граков Б.С., Лубенский Ю.М., Нихинсон Р.А. Методы диагностики и интенсивной терапии в неотложной абдоминальной хирургии. — Красноярск: Изд-во Краснояр. ун-та, 1992. — 240 с.
5. Тоскин К.Д., Старосек В.Н. Хирургическая тактика при остром панкреатите // *Клин. хир.* — 1984. — № 11. — С. 41–43.
6. Кубышкин В.А. Панкреонекроз // *Анналы хир. гепатологии.* — 2000. — Т. 5. № 2. — С. 67–68.
7. Lankisch P.G., Assmus C., Lehnick D. et al. Acute pancreatitis: does gender matter? // *Dig. Dis. Sci.* — 2001. — Vol. 46. — P. 2470–4.

8. Lowenfels A.B., Maisonneuve P., Sullivan T. The changing character of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, and prognosis // *Curr. Gastroenterol. Rep.* — 2009. — N 11. — P. 97–103.
9. Steinberg W., Tenner S. Medical progress: acute pancreatitis // *New Engl. J. Med.* — 1994. — Vol. 330. — P. 1198–210.
10. Tenner S. Initial management of acute pancreatitis: critical decisions during the first 72 hours // *Am. J. Gastroenterol.* — 2004. — Vol. 99. — P. 2489–94.
11. Tenner S., Baillie J., Dewitt J., et al. American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis // *Am. J. Gastroenterol.* — 2013. — Vol. 108. — P. 1400–1415.
12. Working Group IAP/APA Acute Pancreatitis Guidelines. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis // *Pancreatol.* — 2013. — Vol. 13 (4 Suppl 2): e1–e15.
13. Yokoe M., Takada T., Mayumi M., Yoshida M., Isaji S., Wada K., Itoi T., Sata N., Gabata T., Igarashi H., Kataoka K., Hirota M., Kadoya M., Kitamura N., Kimura Y., Kiriya S., Shirai K., Hattori K., Takeda K., Takeyama Y., Hirota M., Sekimoto M., Shikata S., Arata S., Hirata K. Japanese guidelines for the management of acute pancreatitis: Japanese Guidelines 2015 // *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* — 2015. — Vol. 22. — P. 405–432. DOI: 10.1002/jhbp.259.
14. Steinberg W.M., DeVries J.H., Wadden T., et al. Longitudinal monitoring of lipase and amylase in adults with type 2 diabetes and obesity: Evidence from two phase 3 randomized clinical trials with the once-daily GLP-1 analog liraglutide // *Gastroenterology.* — 2012. — Vol. 121: A246.
15. Kylanpa-Bäck M-L., Kemppainen E., Puolakkainen P., Hedström J., Haapiainen R., Korvuo A., Stenman U-H. Comparison of urine trypsinogen-2 test strip with serum lipase in the diagnosis of acute pancreatitis. // *Hepato-Gastroenterology.* — 2002. — Vol. 49. — P. 1130–1134.
16. Fortson M. R., Freeman S. N., Webster P. D. Clinical assessment of hyperlipidemic pancreatitis // *Am. J. Gastroenterol.* — 1995. — Vol. 90. — P. 2134–9.
17. Banks P. A., Bollen T. L., Dervenis C. et al. Classification of acute pancreatitis — 2012: revision of Atlanta classification and definitions by international consensus // *Gut.* — 2013. — Vol. 62. — P. 102–11.
18. Banks P. A., Bollen T. L., Dervenis C. et al. Classification of acute pancreatitis — 2012: revision of Atlanta classification and definitions by international consensus // *Gut.* — 2013. — Vol. 62. — P. 102–11.
19. Marshall J. C., Cook D. J., Christou N. V., et al. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of complex clinical outcome // *Crit. Care Med.* — 1995. — Vol. 23. — P. 1638–52.
20. Banks P. A., Freeman M. L. Practice guidelines in acute pancreatitis // *Am. J. Gastroenterol.* — 2006. — Vol. 101. — P. 2379–400.
21. Ranson J. H., Pasternack B. S. Statistical methods for quantifying the severity of clinical acute pancreatitis // *J. Surg. Res.* — 1977. — N22. — P. 79–91.



Золотой стандарт преаналитики



Комфорт и безопасность от А до Я



**Первые российские
вакуумные пробирки
для взятия венозной крови**

Все виды пробирок доступны для заказа

FUJIFILM

Анализатор Fujifilm DRI-CHEM 4000i

- технология «сухой химии»
- 29 биохимических параметров
- экспресс-анализатор в режиме «реального времени»: время выполнения единичных тестов от 1 до 4 минут
- подходит для отделений реанимации, экспресс-лабораторий, перинатальных центров – там, где требуется быстрый и точный результат



 **ДЕЛЪРУС**

121108, Россия, Москва,
ул. Ивана Франко, 4, корп. 1
Тел.: + 7 (495) 380 36 01,
доб. 1459, 1423, 1439
www.delrus.ru

**Универсальное решение
для экспресс-диагностики**

Влияние физиологических и аналитических погрешностей на интерпретацию количественных результатов лабораторных исследований

И. А. Волкова, к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики

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

Influence of physiological and analytical errors in interpretation of quantitative laboratory results

I. A. Volkova

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

Резюме

Интерпретация результатов лабораторных исследований является одной из самых сложных задач в работе врача. Рассмотрение погрешностей, влияющих на результаты анализа, и их использование при оценке результатов необходимы для врачей разных специальностей. Для интерпретации результатов важно понимание таких принятых терминов как норма, референтные значения и «серая зона». В работе изложены основные принципы оценки результатов, полученных в разных лабораториях, различных единицах измерения, разными методами, в относительном и абсолютном выражении результатов, что актуально как для врачей клинической лабораторной диагностики, так и врачей-клиницистов.

Ключевые слова: интерпретация, количественные исследования, погрешности измерения.

Summary

Interpretation of laboratory results is one of the most difficult tasks in the work of a doctor. Consideration of errors affecting the results of the analysis and their use in the evaluation of results is necessary for the doctors of different specialties. To interpret the results it is important to understand the accepted terminology norm, reference values and the 'gray zone'. The paper presents main principles of evaluation of the results obtained in different laboratories, different measurement units, different methods in relative and absolute terms of results, it is important for the doctors of clinical laboratory diagnostics and the clinicians.

Key words: interpretation, quantitative research, measurement error.

По литературным данным, 60–70% всех медицинских Решений принимаются по результатам лабораторных исследований [3]. Однако результат лабораторного исследования не является диагнозом, а лишь отражает состояние тех или иных органов и систем на момент взятия образца. После проведения анализа возникает одна из самых сложных задач: его интерпретация (оценка).

Для получения диагностически значимых результатов лабораторного исследования необходимо свести к минимуму влияние преаналитического этапа (назначение анализа, сбор и транспортировку биоматериала, первичную обработку проб и др.), достичь получения воспроизводимых и правильных результатов путем постоянного проведения и совершенствования контроля качества (КК), максимально снизить количество случайных ошибок за счет автоматизации процесса лабораторного исследования.

При оценке результатов анализа необходимо ответить на вопросы:

1. является ли результат нормой;
2. существенны ли отличия от предыдущих результатов;
3. соответствует ли результат клиническим наблюдениям.

Погрешности измерения

Аналитическая погрешность

Любой экспериментально полученный результат содержит погрешность измерения: отклонение результата измерения от действительного значения измеряемой

величины. Это значит, что полученный результат отражает не конкретное значение, а интервал концентраций в соответствии с объективной ошибкой измерения. Например, если измеренная концентрация мочевины 10 ммоль/л, а погрешность измерения составляет 5% (0,5 ммоль/л), то реальная концентрация мочевины будет находиться в диапазоне ($10 \pm 0,5$), то есть от 9,5 до 10,5 ммоль/л.

В клинко-диагностической лаборатории аналитическая погрешность измерения может быть определена по результатам контроля качества.

Внутрииндивидуальная вариация

При повторных измерениях одного и того же показателя у одного и того же человека результаты тестов не будут одинаковы, а станут колебаться вокруг некоторой величины, так называемой гомеостатической точки. Колебания показателя у одного и того же человека обусловлены влиянием биологических ритмов, уровнем физической активности, питанием, приемом алкоголя, лекарств, курения и др. Эти изменения называются внутрииндивидуальной вариацией. Для большинства показателей индивидуальные колебания установлены и представлены в виде коэффициента внутрииндивидуальной (индивидуальной) вариации CVi%.

Таким образом, внутрииндивидуальная вариация отражает различия показателей одного и того же человека в зависимости от биологических ритмов и образа жизни.

Межиндивидуальная (групповая) вариация

Различие показателей внутри определенной группы людей обусловлено факторами, характерными для популяции, объединенной расовыми, половыми, возрастными и другими признаками. Указанные факторы формируют пределы колебаний значений, присущие для популяции здоровых людей, объединенных по определенному признаку (полу, возрасту, и др.) с учетом влияния внешней среды. Для большинства показателей групповые колебания установлены и представлены в виде коэффициента межиндивидуальной (групповой) вариации CVg%.

Таким образом, групповая вариация отражает различия показателей популяции, объединенной по тому или иному признаку с учетом средовых и генетических факторов.

Измерением, уточнением и обобщением коэффициентов индивидуальной и групповой вариации занимаются специалисты в разных странах. В частности, Джеймс Вестгард (США) систематизировал коэффициенты индивидуальной и групповой вариаций и разместил их на сайтах westgard.com/biodatabase1.htm и westgard.com, доступных для любого пользователя интернета. Обновление данных сайтов проводится каждые два года. Коэффициенты для некоторых аналитов приведены в табл. 1 [1].

Пределы групповой вариации аналита (CVg), как правило, шире пределов индивидуальной вариации (CV). Более высокая индивидуальная вариация для концентрации железа свидетельствует о преобладании индивидуальных различий над групповыми.

Норма и референтные интервалы

При измерении каких-либо физиологических параметров (например, массы тела, пульса, лабораторных показателей и др.) результаты оценивают, сравнивая их с нормальными значениями. Биологическое разнообразие и выраженная индивидуальность человека не позволяют провести четкие границы между нормальными и патологическими значениями. Поэтому в последнее десятилетие термин «норма» в плане оценки результатов измерений был заменен на термин «референтные значения» (пределы, интервалы) [6]. Термин «референтные интервалы» не снимает ограничения по оценке показателя как норма или патология, а лишь констатирует выход или не выход за установленные значения.

Норма — это показатели, соответствующие состоянию здорового человека [3]. Норма индивидуальна, так как уровень гомеостатических показателей формируется на основании генетической информации, скорректированной влиянием внутренних и внешних факторов.

Референтные интервалы — это справочные значения, с которыми сравнивают результаты анализа пациента. Референтные значения для каждой популяции определяют пределы колебаний, обусловленные групповой вариацией в соответствии с полом, возрастом и методом исследования [6]. Границы референтных интервалов в настоящее время определены для всех количественных тестов.

Под влиянием факторов различных видов вариаций может быть взаимное перекрытие нормальных и патологических значений. В результате перекрывания

Таблица 1
Коэффициенты индивидуальной (CV) и групповой (CVg) биологических вариаций для некоторых аналитов

Аналит	Биологическая вариация, %	
	CVi	CVg
Кальций	1,9	2,8
Альбумин	3,1	4,2
Билирубин	23,8	39,0
Железо	26,5	23,2
Натрий	0,7	1,0
АЛТ	24,3	43,6

Примечание: аналиты с высоким CV_i будут показывать больший разброс при повторных измерениях (билирубин, железо, АЛТ).

формируется так называемая серая зона или зона неопределенности [6] — область значений, которые могут встречаться и у здоровых, и у людей, больных тем или иным заболеванием. Серая зона присутствует при всех видах исследований. При попадании результатов в серую зону их нельзя расценивать ни как норму, ни как патологию. Для подтверждения клинического предположения анализ рекомендуется проводить в другой серии для подтверждения результата или через какой-то временной интервал для оценки изменения показателя во времени (динамического наблюдения).

Оценка результатов

Первый вопрос, на который необходимо ответить при получении результатов лабораторных исследований: является ли результат нормой?

При оценке лабораторных показателей важно определить порог клинического решения (дискриминационный уровень), т.е. величину, выше или ниже которой врачу рекомендуется предпринять определенные действия [3]. Для многих показателей эта величина соответствует референтным пределам. Для активности ферментов вследствие высоких CV_i и CV_g принят дискриминационный уровень, составляющий 50 % от референтного предела (α-амилаза — не менее 30 %). Однако референтные значения не всегда следует принимать за истину, так как они имеют ряд ограничений.

- Референтные интервалы — статистически полученные значения, которые охватывают 95 % популяции. У 5 % здоровых людей нормальные уровни находятся выше или ниже референтных значений.
- Результаты анализов отличаются при повторных измерениях.
- На результаты анализов влияют эндогенные, экзогенные, генетические, статистические и лабораторные факторы.
- Референтные интервалы не позволяют осуществлять персональный подход к состоянию здоровья пациента.
- Референтные интервалы малоприменимы для динамического наблюдения и выявления патологии на субклинических и (или) латентных стадиях [5].

Результаты, входящие в референтные пределы, не всегда норма. Результаты, близкие к границам интервалов, нельзя однозначно оценивать как патологические или нормальные. Для выявления патологии отклонения должны быть дифференцированы от колебаний результатов, вызванных другими причинами (перекрыванием референтных интервалов, выходом индивидуальных значений за референтные интервалы и др.).

Использование статистических показателей для интерпретации результатов количественных лабораторных исследований

Для оценки показателей количественных лабораторных исследований используются данные индивидуальной вариации (CV_i) и показатели контроля качества: коэффициент аналитической вариации (CV_A), смещение (B) и показатель Z -score.

Z -score (Z -оценка, Z -о) отражает степень отклонения результата от среднего в единицах среднеквадратичного отклонения S .

Допустимые значения Z -score рассчитаны для стандартной достоверности (95 %) и высокой достоверности (99 %) (табл. 2).

Таблица 2
Значения Z -score при разных уровнях достоверности

Достоверность	Односторонняя Z -score	Двухсторонняя Z -score
95% (2S)	1,65	1,96
99% (3S)	2,33	2,58

В обычной практике используются значения с уровнем достоверности 95 %. При расчетах может быть использована односторонняя Z -score, когда нужно оценить изменение показателя в одну сторону (увеличения или уменьшения), или двухсторонняя при оценке изменения показателя в обе стороны.

Оценка достоверности выхода результата за референтные пределы

В ряде случаев лаборатория получает результаты, которые незначительно выходят за референтные пределы. У врача возникает вопрос, как оценивать полученный результат. Правило для оценки активности по отношению к другим анализам не применимо. В сложных диагностических ситуациях лаборатория может учесть аналитическую погрешность измерения, которая рассчитывается на основе результатов контроля качества по общей аналитической ошибке [5]. Для исключения влияния аналитической погрешности референтный интервал меняется на величину общей аналитической ошибки: при *пониженном* результате нижняя граница интервала *уменьшается* на $TEa\%$, при *повышенном* результате верхняя граница интервала *увеличивается* на $TEa\%$.

Общая аналитическая ошибка:

$$TEa\% = (1,65 \times CV_A) + |B|, \text{ где}$$

TEa — общая аналитическая ошибка; 1,65 — односторонний Z для вероятности 95%; $CV_A\%$ — коэффициент аналитической вариации из внутреннего КК (ВКК); B —

смещение по абсолютной величине из внешней оценки качества (ВОК) КДЛ. Данные КК должны соответствовать отраслевому стандарту и критериям ВОК [4].

Клинический пример

Оценить достоверность выхода за референтные интервалы уровня лейкоцитов (табл. 3).

Таблица 3

Показатель	Результат	Референтные интервалы	CV_A (ВКК)	B (ВОК)
Лейкоциты, тыс./мкл	9,8	4-9	5,5%	5,6%

Лейкоциты $TEa\%$: $(1,65 \times CV_A\%) + |B| = (1,65 \times 5,5) + 5,6 = 14,68$ (%) или 0,1468.

Результат повышен — увеличивается верхняя граница интервала.

$$9 + (9 \times 0,1468) = 9 + 1,32 = 10,32$$

(уточненная верхняя граница).

Сравнивается результат анализа с новым верхним пределом.

$$9,8 < 10,32$$

(результат находится внутри уточненного интервала).

Изменение уровня лейкоцитов нельзя оценивать как патологическое. Выход за референтный интервал может быть обусловлен аналитическими погрешностями измерения.

Оценка достоверности выхода результатов за референтные пределы нуждается в данных КК лаборатории, что может создавать сложности для врача-клинициста. В некоторых лабораториях знак выхода за референтные значения ставится в случае выхода результатов за референтные значения с учетом погрешности измерения, рассчитанной по данным контроля качества.

Повышенный или пониженный уровень аналита может быть нормальным для данного пациента, поэтому однократное измерение показателя при его близости к референтным пределам практически не несет диагностической информации. Только существенное отклонение показателя от референтных значений может расцениваться как патологическое, поэтому референтные интервалы считают мало пригодными для динамического наблюдения и выявления патологии на субклинических и (или) латентных стадиях.

Динамическое наблюдение

Второй вопрос, на который врачу следует ответить, существенны ли отличия от предыдущих результатов, то есть провести динамическое наблюдение: оценку изменения лабораторных показателей во времени. Метод используется для наблюдения за развитием патологического процесса, эффективности проводимого лечения и выявления патологического процесса на ранних стадиях при условии известных нормальных показателей пациента, полученных, например, при диспансеризации.

Для динамического наблюдения исследования рекомендуется проводить одними и теми же методами в одних и тех же единицах измерения в одной и той же лаборатории: измерения, проведенные разными методами или

одним и тем же методом, но реагентами разных производителей, отличаются как в цифровом выражении, так и по значениям референтных пределов. Между результатами, полученными в разных лабораториях даже при использовании одних и тех же методов, допускается весьма существенный разброс, который зависит от вида исследования и не позволяет адекватно отслеживать показатель пациента в динамике.

Динамическое наблюдение в настоящее время является важной, если не основной формой лабораторной оценки состояния пациента. Оно позволяет осуществлять персональный подход к состоянию здоровья пациента и при правильном проведении выявить патологию на субклинических и (или) латентных стадиях.

Определение критической разницы для оценки достоверности различий при динамическом наблюдении

При развитии патологического процесса и лечении пациента необходимые для наблюдения показатели будут меняться, причем диагностически значимые изменения могут находиться как внутри, так и вне зоны референтных интервалов. Для правильной оценки клинической ситуации необходимо выяснить, чем обусловлены эти изменения: состоянием пациента или суммой погрешностей, которые являются неотъемлемой частью любого измерения.

Ранее для оценки клинической значимости изменений при динамическом наблюдении использовали субъективную оценку, основанную на опыте врачей-экспертов, которая часто не совпадала у разных специалистов. В последнее время используется объективный математический критерий, который позволяет с 95 % вероятностью выявить достоверное, то есть клинически значимое изменение показателя [5]. Критерий называется *критической разницей* и обозначается как RCV% (reference change value). Критическая разница используется для оценки достоверности различий при динамическом наблюдении тех аналитов, степень изменения которых принципиальна для принятия правильного клинического решения (назначения или изменения дозы препарата, оценки состояния пациента и др.).

Расчет критической разницы проводится на основании аналитической погрешности измерения и коэффициента индивидуальной вариации:

$$RCV\% = \sqrt{2} \times Z \times \sqrt{(CV_A^2 + CV_i^2)}, \text{ где}$$

$Z = 1,96$ (двухсторонний при принятой вероятности 95 %, так как изменения могут быть направлены в обе стороны), $\sqrt{2} = 1,414$; CV_A (%) — коэффициент аналитической вариации из ВКК КДЛ; CV_i (%) — коэффициент индивидуальной вариации из таблицы Вестгарда.

После проведенных расчетов конечная формула сокращается:

$$RCV\% = 2,77 \times \sqrt{(CV_A^2 + CV_i^2)}.$$

Оценка проводится путем сравнения RCV% с разницей изменений показателя пациента в процентах (change value, CV%), которая рассчитывается по отношению к первому измерению.

Оценка результатов

CV% пациента больше RCV% — изменение значимо.

CV% пациента меньше RCV% — изменение не значимо.

Клинический пример

Оценить эффективность лечения пациента Р. статинами по RCV% (табл. 4).

Таблица 4
Изменение уровня холестерина пациента Р. при лечении статинами

Холестерин общ.	1-е измерение	2-е измерение	Реф. значения
Результаты, ммоль/л	7,8	6,8	3,5–5,7

Расчет проводится по отношению к первому измерению. Данные, необходимые для расчета.

$$CV_i = 5,4\% \text{ (из таблицы Вестгарда);}$$

$$CV_A = 3\% \text{ (из КК КДЛ).}$$

Расчет разницы показателей (в процентах) по результатам пациента:

$$\text{разность: } 7,8 - 6,8 = 1,0; \text{ процент от первого} = (1,0 / 7,8) \times 100\% = 12,3\%.$$

Изменение показателя пациента составляет 12,3 %.

Расчет критической разницы

$$RCV\% = 2,77 \times \sqrt{(3^2 + 5,4^2)} = 2,77 \times \sqrt{38,16} = 2,77 \times 6,18 = 17,1\%$$

$$RCV\% = 17,1\%$$

CV пациента меньше RCV (12,3 % < 17,1 %). Изменение параметра пациента меньше критической разницы. Изменение диагностически не значимо.

Важно, что критерий RCV может рассматриваться как критерий доказательной медицины, объективно подтверждающий изменение состояния пациента.

Оценка результатов анализов проводится врачом-клиницистом, который для расчета RCV% должен обращаться в лабораторию, что с технической точки зрения не всегда возможно. В некоторых отечественных и зарубежных литературных источниках [7] приводится упрощенная формула расчета критической разницы без учета коэффициента аналитической вариации лаборатории:

$$RCV\% \text{ упрощ.} = 2,77 \times CV_i.$$

Формула исключает CVa лаборатории, проводившей исследование, поэтому значения RCV% по упрощенной формуле будут ниже, чем по полной формуле.

Клинический пример

Ребенку О. определили концентрацию свободного трийодтиронина (Т3 св.) с разницей в один год. Измерения проводились в одной и той же лаборатории на одинаковых реактивах. Оценка результатов осложнялась тем, что за месяц до второго определения производители реагентов прислали уточненные референтные пределы (табл. 5).

Оба результата находятся в референтных пределах, несмотря на рост концентрации Т3 св. на 1,5 пмоль/л (31,2 %). Расчет RCV% как по полной, так и по упрощенной формуле показал клинически значимое повышение Т3 св. (CV% пациента больше RCV%).

Таблица 5
Измеренные и расчетные показатели ребенка О

Аналит	№	Результат	Реф. пред.	CVi%	CVa%	CV% пац.	RCV%	RCV% упрощ.
ТЗ св.	1	5,13 пмоль/л	2,63–5,7	7,9	-	-	-	-
ТЗ св.	2	6,73 пмоль/л	4,29–6,79	7,9	3	31,2	23,4	21,9 (-6%)

Таким образом, при динамическом наблюдении наиболее важно клинически значимое изменение показателя независимо от его нахождения внутри или вне зоны референтных интервалов.

Ряд отечественных специалистов по лабораторной диагностике считают неприемлемым использовать упрощенную формулу без учета CVa. Вклад аналитической вариации зависит от качества работы лаборатории. На основании индивидуальной вариации CVi% определены биологически обоснованные критерии точности. Критерии рассчитаны для разных уровней точности: минимального (1-го), базового (2-го) и максимального (3-го) [1, 5]. В соответствии с критериями CVa лаборатории не должен превышать при минимальном уровне точности 0,75CVi, базовом уровне точности — 0,5CVi, а максимальном уровне точности — 0,25 CVi. Вклад CVa% в RCV% в КДЛ, работающей при максимальном уровне точности, может составить не более 3 %, при базовом уровне точности — не более 11 %, а при минимальном — не более 25 % [$\sqrt{(CVi^2 + 0,75 CV_i^2)}$].

На основании выше изложенного рекомендуется следующая оценка результатов RCV% по упрощенной формуле на основании максимально допустимого CVa. При получении CV% пациента меньше RCV% упрощ. изменение значения показателя однозначно диагностически не значимо; при CV% пациента больше RCV% упрощ. в 1,25 раза и более изменение значения показателя трактуется как диагностически значимое. При промежуточных значениях необходим расчет по полной формуле. В приведенном примере CVa увеличила RCV на 6 %, что соответствует базовому уровню работы лаборатории.

Для клинициста упрощенная формула актуальна, так как обеспечивает возможность быстрой и более объективной по сравнению с экспертным мнением оценки изменения результата пациента.

Заключение

Оценка результатов лабораторных исследований проводится путем сравнения с референтными пределами и путем динамического наблюдения.

При сравнении с референтными пределами необходимо иметь в виду, что не все результаты, входящие в референтные пределы, — норма, и не все результаты, выходящие за референтные пределы, — патология. Результаты, близкие к пределам референтных значений, нельзя оценивать однозначно как нормальные или патологические.

В неоднозначных клинических ситуациях расчет общей аналитической ошибки по результатам контроля качества позволяет исключить аналитическую погрешность изме-

рения и подтвердить или не подтвердить выход результата исследования за референтные пределы. Высокий уровень воспроизводимости результатов анализа снижает аналитическую погрешность измерения.

Для динамического наблюдения исследования рекомендуется проводить одними и теми же методами в одних и тех же единицах измерения, желательно в той же лаборатории.

Клинически значимое изменение показателя зависит от его степени и может наблюдаться как внутри, так и вне зоны референтных интервалов, что связано с существенными индивидуальными различиями содержания аналитов у разных людей. Полезно сравнивать результаты анализа пациента в состоянии болезни с его нормальными показателями, измеренными в здоровом состоянии.

Для оценки диагностической значимости изменения показателя при динамическом наблюдении доступна объективная оценка путем расчета критической разницы RCV%, которая может рассматриваться как критерий доказательной медицины, подтверждающий изменение состояния пациента или эффективность его лечения.

Результаты лабораторных исследований необходимо оценивать с учетом влияния неустраняемых факторов, клинической ситуации и опыта, так как клиническое решение является продуктом мультивариантного анализа [5]. Установить истину помогают клинический статус пациента и определение показателей в динамике.

Список литературы

1. Арефьева И. А., Федорова М. М., Мошкин А. В. «Планирование аналитического качества количественных лабораторных исследований с использованием коммерческих контрольных материалов». Методические рекомендации, М., 2013
2. Волкова И. А. Некоторые аспекты интерпретации результатов лабораторных исследований. Справочник заведующего, № 2, 2016, 27–37.
3. «Клинический диагноз — лабораторные основы» под ред. В. В. Меньшикова, М., 1997.
4. Приказ № 220 от 26 мая 2003 года «Об утверждении отраслевого стандарта „Правила проведения внутрилабораторного КК количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов“».
5. Фрейзер К. Г. Биологическая вариация: от теории к практике. М., Медиздат, 2010.
6. Хиггинс К. «Расшифровка клинических лабораторных анализов», 3-е издание, М., Бином, Лаборатория знаний, 2008.
7. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jiménez CV et al. Scand J Clin Lab Invest 1999; 59: 491–500



Надежность и безопасность в лабораторном секторе



- Электроника блока управления Comfort позволяет точно задать температуру хранения;
- Наличие сигнализации: в случае отклонения температуры или незакрытой двери, при пропадании питания по сети (визуальная)
- Интегрированная регистрация и хранение данных min\max температуре, о случаях срабатывания сигнализации и пропадания питания по сети
- RS 485 интерфейс и безпотенциальные контакты для дополнительной регистрации данных о температуре и сигнализации
- 1 точка калибровки обеспечивает точный контроль температуры хранения
- Имеются также модели со взрывобезопасным внутренним объемом, согласно требованиям ATEX 95

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

LIEBHERR

Качество, дизайн и инновации

Актуальные аспекты подготовки тромбоцитов человека к использованию в регенеративной медицине

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

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

Actual aspects of human platelets preceeding treatments for use in regenerative medicine

M. S. Makarov

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

Резюме

В статье рассматриваются вопросы, связанные с подготовкой тромбоцитов человека для разных целей регенеративной медицины, в свете совершенствования методик запуска и реализации биологического потенциала тромбоцитов.

Ключевые слова: **тромбоциты, гранулы, дегрануляция, регенеративная медицина.**

Summary

The human platelet preparing for different aims of regenerative medicine was described in the light of upgrading methods, based on platelets' biological potential stimulation and realization.

Key word: **platelets, granules, degranulation, regenerative medicine.**

Тромбоциты человека содержат большое количество биологически активных веществ с высоким репаративным потенциалом [18–20, 29, 30], который может быть использован в лечении многих тканевых дефектов. Для успешного применения тромбоцитов или их компонентов в регенеративной медицине немаловажную роль играет доклинический этап, связанный с подготовкой тромбоцитов, выбором наиболее адекватной техники их использования. В зависимости от типа патологии стимуляция репаративных процессов и, соответственно, доклиническая подготовка тромбоцитов могут осуществляться разными способами.

Выбор источника тромбоцитов

В настоящее время единственным эффективным источником тромбоцитов человека является кровь, из которой можно получить богатую тромбоцитами плазму (БоТП), аферезный тромбоцитный концентрат (ТК), лейкотромбослой (ЛТС) [5, 6]. Считается, что для регенеративной медицины наиболее подходит выделенная из крови пациента аутологичная БоТП, которая не вызывает иммунологических осложнений [18]. С другой стороны, качество тромбоцитов (их структурная целостность и функциональная активность)

бывает снижено при многих патологиях, иногда это снижение является очень резким [17]; кроме того, даже у здоровых людей содержание биологически полноценных тромбоцитов с гранулами ($D_{тр.гр.}, \%$) может сильно варьировать [7, 8]. По нашим данным, репаративный эффект аутологичной БоТП заметно слабее при уровне $D_{тр.гр.}$ меньше 30% (норма в циркулирующей крови 35–75%). Стоит отметить, что значения $D_{тр.гр.}$ равные 20–30%, довольно часто встречаются у пациентов и не приводят к развитию геморрагических осложнений, однако полученная у них аутологичная БоТП может быть недостаточно эффективной для репарации тканей. Кроме того, у пациентов с воспалительными процессами повышена вероятность того, что в БоТП попадут лейкоциты или даже целые лейкоцит-тромбоцитарные комплексы [30]. Есть мнение, что присутствие лейкоцитов в БоТП увеличивает ее антибактериальное действие [22], однако при этом часто происходит угнетение репаративных процессов [22, 28–30]. Поэтому большинство исследователей рекомендуют применять БоТП без лейкоцитов. В тех случаях, когда репарация не подразумевает прямого и частого контакта тромбоцитов с клетками циркулирующей крови, представляется

адекватным использование аллогенной БоТП или ТК. Морфофункциональный анализ тромбоцитов позволяет отбирать дозы с высоким уровнем $D_{тр.гр.}$ и, соответственно, высоким содержанием репаративных факторов. Если учесть, что объем одной дозы ТК составляет 100–120 мл, то общее число тромбоцитов с гранулами в ней может достигать 200 млрд. Стандартная доза БоТП обычно не превышает 10–20 мл и содержит не более 10–15 млрд биологически полноценных тромбоцитов, поэтому при массовом производстве тромбоцит-насыщенных препаратов будет удобнее использовать ТК, а не БоТП. При этом у здоровых людей уровень $D_{тр.гр.}$ в БоТП и аферезных ТК является сходным. В ЛТС, полученном из цельной крови, концентрация тромбоцитов может быть в 2–5 раз больше, чем в БоТП или ТК, однако их качество достоверно ниже [7, 9, 10]. Простота получения ЛТС сочетается с фактическим неиспользованием этого продукта в трансфузиологии: фракция ЛТС, по сути, является «отходом» производства при заготовке плазмы и эритромаcсы, хотя потенциально содержит большое количество биологически активных тромбоцитов. Считается, что ТК, полученные путем пулирования тромбоцитов ЛТС,

имеют повышенный риск выбраковки в случае контаминации [6], кроме того, тромбоциты ЛТС очень быстро теряют свою жизнеспособность в процессе краткосрочного хранения [8]. Все это снижает пригодность тромбоцитов ЛТС для задач регенеративной медицины. С другой стороны, дозы ЛТС можно использовать, в частности, как первичное сырье для выделения уже отдельных компонентов, секретируемых тромбоцитами.

Оптимизация процедуры центрифугирования

Центрифугирование применяется практически во всех методах выделения тромбоцитов. Для получения аутологичной БоТП из цельной крови обычно используют «мягкое» ускорение от 150 до 500 g [5, 15, 19], хотя в ряде работ БоТП выделяют при 600–800 g [16–18]. Общая концентрация клеток в полученных образцах может весьма варьировать; есть мнение, что полноценная БоТП должна содержать не менее 1 млн тромбоцитов на 1 мкл [29–31], то есть фактически равнозначна тромбоконцентрату. Для получения указанной концентрации в одних работах рекомендуется использовать ускорение 700–800 g [16, 18, 20], в других только 460–500 g [12, 15]; считается, что правильно подобранное ускорение позволяет тонко разделить фракцию плазмы на дополнительные фракции. Собственно БоТП представляет собой та из них, которая после центрифугирования расположена ближе всего к слою лейкоцитов. Над этой фракцией находятся фракции с меньшим содержанием тромбоцитов, их использовать не рекомендуют; отбор БоТП осуществляют путем предварительного удаления всех верхних фракций плазмы или путем аккуратного аспирирования нижней фракции, что в обоих случаях создает риск спонтанного перемешивания плазмы. Во многих работах описаны идеи оптимизации этих методик за счет тонкого подбора ускорения, температурного режима и времени центрифугирования [18–20, 27], однако единого мнения о режимах центрифугирования не найдено. Кроме того, подобную оптимизацию (весьма длительную) необходимо проводить для каждого типа центрифуги отдельно,

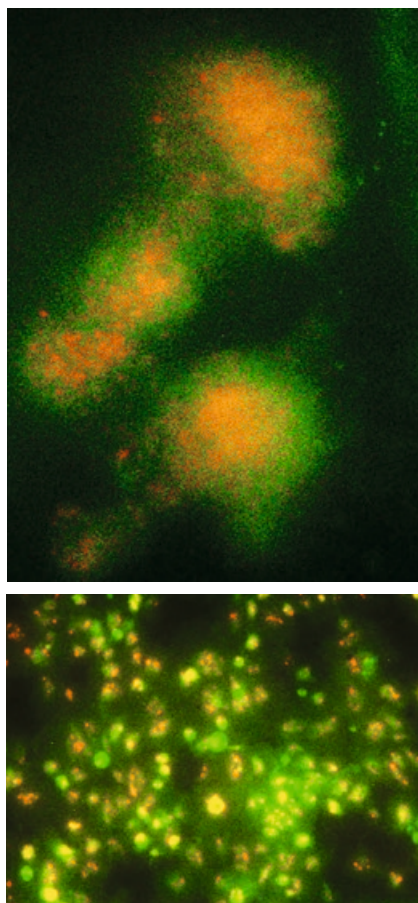


Рисунок 1. Адгезия тромбоцитов с гранулами на коллагеном субстрате: а) в плазме; б) в изотоническом растворе хлорида натрия. Витальная окраска трипафлавином и акридиновым оранжевым. Увеличение: 1500×.

что требует большой подготовки. Гораздо удобнее представляется следующая процедура: сначала провести «мягкое» центрифугирование крови для выделения плазмы с тромбоцитами, которую затем можно концентрировать путем «жесткого» центрифугирования, осаждающего тромбоциты. В трансфузиологии широко распространено центрифугирование при 3,5–4,5 тыс. g, которое разделяет кровь на три фракции: бесклеточную плазму, лейкотромбоцитарный слой и эритромассу [15]. Однако в этом случае снижается содержание биологически полноценных тромбоцитов: по нашим данным, после центрифугирования при 3,5–4,5 тыс. g популяция тромбоцитов с гранулами теряет до 25% от всего своего состава [10]. Если в исходной крови доноров и в БоТП после мягкого центрифугирования уровень $D_{тр.гр.}$ составляет в среднем 55–56%, то в ЛТС всего 40–42%, а нижние пределы $D_{тр.гр.}$ в этом случае

составляют 35 и 20% соответственно [8]. В процессе выделения тромбоцитов с помощью аппаратного афереза используется ускорение 1 тыс. g, при этом качество клеток в полученных ТК практически не отличается от того, что наблюдалось в исходной крови донора [10]. Исследования *in vitro* подтверждают, что ускорение от 1 до 2 тыс. g значительно не влияет на пул тромбоцитов с гранулами и не снижает их морфофункциональных характеристик [9]. Следовательно, такое ускорение оптимально для концентрирования тромбоцитов.

Таким образом, для наилучшей сохранности тромбоцитов с гранулами рекомендуется выделять плазму при 300–350 g, а затем концентрировать при 1–2 тыс. g. В зарубежной литературе указывается, что для целей регенеративной медицины наиболее подходит БоТП, содержащая 2–3 млн тромбоцитов на 1 мкл [20, 29], хотя и нет четкого обоснования именно такой концентрации. При этом стоит отметить, что ресуспендирование тромбоцитов можно проводить как плазмой (свободной от клеток), так и другой физиологической средой; в бесплазменной среде невозможна агрегация тромбоцитов, однако если значения pH и тоничности раствора соответствуют норме, морфофункциональный статус тромбоцитов сохраняется. Это показано нами на примере 0,15 М фосфатно-солевого буфера PBS (pH = 7,2–7,4) и изотоничного раствора хлорида натрия. Концентрирование тромбоцитов в бесплазменной среде может быть особенно необходимо при изготовлении тромбоцит-насыщенных биотрансплантатов. Так, при контакте БоТП с адгезивным субстратом (коллаген, хитозан и др.) все тромбоциты с гранулами чаще всего адгезируют с образованием крупных уплощенных агрегатов (рис. 1 а) и почти никогда не адгезируют поодиночке. Образование агрегатов резко повышает вероятность быстрой дегрануляции значительной массы клеток и потери ими биологически активных веществ. В то же время в условиях бесплазменной среды тромбоциты с гранулами адгезируют по отдельности (рис. 1 б), лучше проникают вглубь адгезивного субстрата, при

этом вероятность потери гранул заметно ниже, чем в плазме. Суспензия тромбоцитов в виде БоТП адекватна для инъекционного введения, а также для производства биоконструкций, предназначенных для быстрого использования. Отмывание тромбоцитов от плазмы может быть эффективно при производстве сложных комбинированных биотрансплантатов.

Необходимость патоген-инактивации

В процессе заготовки компонентов крови всегда важно максимально снизить риск передачи гемотрансмиссивных инфекций. Эта проблема обостряется при активизации массового донорства, при работе в регионах с неблагоприятной эпидемиологической обстановкой [4, 14], однако даже у кадровых доноров имеется вероятность невыявления контаминаций в условиях серонегативного окна [6, 15]. Поэтому проблема карантинизации компонентов крови всегда является актуальной.

Тромбоциты человека могут быть карантинизированы только в случае их длительного хранения путем криоконсервации. Эффективные методы криоконсервирования тромбоцитов до сих пор очень слабо распространены в службе крови [2]; в условиях, когда доступно лишь краткосрочное хранение тромбоцитов (в пределах, установленных регламентом), единственным способом устранения риска инфицирования патогенами является их направленная инактивация. К настоящему моменту наиболее распространены фотодинамические методы патоген-инактивации с использованием ДНК- и РНК-интеркаляторов, в первую очередь амotosалена. Считается, что амotosален-индуцированная обработка компонентов крови полностью нейтрализует большинство известных болезнетворных микроорганизмов [25]. Действие амotosалена собственно на сами тромбоциты достаточно противоречиво. Так, есть данные, что обработка амotosаленом не повышает рисков развития спонтанной активации или апоптоза тромбоцитов. В условиях короткого хранения уровень Р-селектина и фосфатидилсерина в па-

тоген-инактивированных ТК имеет такую же динамику, что и в стандартных ТК [13]. Считается, что использование амotosален-обработанных ТК не оказывает значительного отрицательного влияния на клиническую эффективность трансфузий, хотя при этом скорректированное число прироста тромбоцитов и их выживаемость в крови достоверно ниже, чем при использовании обычных ТК [11, 36]. Также отмечается снижение коагуляционных свойств ТК *in vitro* [36, 39]. Наши исследования показывают, что уже через 10–15 минут после патоген-инактивации с использованием амotosалена (технология ИНТЕРСЕПТ) ТК теряют от 4 до 15 % тромбоцитов с гранулами, через одни сутки хранения потери составляют в среднем 29 %, через двое суток — 38 %, через трое — 90 % [3]. Для обычных ТК динамика снижения числа тромбоцитов с гранулами через 1–3 суток составляет в среднем 8, 15 и 70 % соответственно [8], то есть патоген-инактивация ТК вызывает ускоренную потерю пула биологически полноценных клеток. При этом ТК с исходным уровнем $D_{тр.гр.}$ выше 60 % после инактивации патогенов сохраняют нормальный морфофункциональный статус тромбоцитов в течение двух суток и, следовательно, более предпочтительны для короткого хранения. Нужно подчеркнуть, что технология инактивации патогенов ИНТЕРСЕПТ не вызывала спонтанной активации и дегрануляции тромбоцитов. Можно предположить, что снижение уровня $D_{тр.гр.}$ обусловлено именно структурными нарушениями тромбоцитов. В тромбоцитах нуклеиновые кислоты локализованы в митохондриях (кольцевая ДНК, транспортные РНК), в немногочисленных рибосомах и в гранулах (микроРНК, информационные РНК) [9, 26, 33]. Судя по всему, амotosален не вызывает нарушения функций митохондрий тромбоцитов и не запускает митохондриальный путь апоптоза. Не исключено, что интеркаляция амotosалена с микроРНК вызывает развитие у последних нестандартных реакций, которые приводят к дегенерации тромбоцитарных гранул. В целом технология ИНТЕРСЕПТ

позволяет получить биологически безопасные ТК без значительного снижения качества клеток в их составе, однако использовать ТК стоит непосредственно после инактивации патогенов.

Пути использования биологического потенциала тромбоцитов в регенеративной медицине

Тромбоциты содержат свыше 200 типов секреторных белков и по этому способны стимулировать многие физиологические реакции [32]. *In vivo* высвобождение тромбоцитарных биологически активных компонентов фактически осуществляется лишь одним способом — через дегрануляцию тромбоцитов в процессе активации. В лабораторных условиях эти компоненты можно также выделить путем криодеструкции тромбоцитов при низких и ультранизких температурах, с помощью высоких доз детергентов (диметилсульфоксид, тритон X-100), кроме того, фракцию гранул тромбоцитов можно селективно выделить путем центрифугирования БоТП при 12–22 тыс. g [26]. При этом нужно учитывать, что высвобождение всего объема тромбоцитарных гранул далеко не всегда адекватно при клинической работе. Известно, что компоненты гранул тромбоцитов участвуют в развитии многих патофизиологических процессов, а также могут ухудшать течение уже имеющихся патологий [23, 29, 33]. Поэтому способы реализации биологического потенциала тромбоцитов должны соответствовать поставленной клинической задаче.

Так, использование БоТП с интактными (неактивированными) клетками оправданно в случае инъекционного введения в ткани, насыщенные адгезивно привлекательными субстратами. К ним относятся кожа, хрящ, сухожилия и связки; при контакте с межклеточным матриксом этих тканей (коллаген, гиалуроновая кислота, лектины) тромбоциты будут массово активироваться и дегранулировать, стимулируя в первую очередь ангиогенез и пролиферацию диплоидных клеток [24, 28]. В тех ситуациях, где для лекарственных

сред требуется повышенная проникающая способность, очень эффективной может быть БоТП с 30–40 % диметилсульфоксида (ДМСО). Для медицинских целей ДМСО используется преимущественно в качестве трансдермального агента; в то же время известно, что при 30–40 % в БоТП происходит быстрая и массовая дегрануляция всех биологически активных тромбоцитов [10]. Таким образом, комбинация БоТП с ДМСО позволила бы доставлять секретируемые тромбоцитами факторы репарации внутрь плотных тканей с плохо развитой системой сосудов, например, при лечении ревматических заболеваний и амилоидоза.

В работе с клеточными культурами *in vitro* интенсивный рост клеток наблюдается при использовании предварительно активированной или криодеструктурированной БоТП [16, 21]. Судя по всему, наиболее адекватным активатором тромбоцитов в данном случае является коллаген, поскольку другие широко доступные активаторы (тромбин, адреналин, 10-процентный хлорид кальция) дают меньший рост-стимулирующий эффект. Компоненты тромбоцитарных гранул при введении в культуральную среду способны значительно усилить пролиферативную активность клеток, в том числе мультипотентных [16, 21, 22, 35]. Однако в данном случае особенно остро встает проблема расчета адекватной дозы БоТП. В большинстве работ она просто отсутствует, в отдельных случаях оценивается концентрация определенных факторов из гранул тромбоцитов без определения качества самих клеток. В результате в работе с культурами разных типов неоднократно показано ингибирующее и про-апоптотическое действие БоТП [23, 37]. По нашим данным, диплоидные клетки (фибробласты человека, ММСК костного мозга) имеют наибольшую пролиферативную активность без снижения их жизнеспособности при использовании 100–150 млн тромбоцитов с гранулами в расчете на 100 тыс. клеток в культуре. При уровне тромбоцитов с гранулами 200 млн и выше происходит выраженное угнетение

жизнедеятельности клеток. Однако если тромбоцитарные компоненты не находятся в культуральной среде непосредственно, то подобное угнетение может отсутствовать. Так, при использовании тромбоцитарного геля (полученного из БоТП путем активации 10-процентным хлоридом кальция) с общим содержанием тромбоцитов с гранулами свыше 200 млн жизнедеятельность фибробластов человека несколько не снижается, более того, отмечается дозозависимый эффект стимуляции пролиферации фибробластов по мере повышения общего числа тромбоцитов с гранулами в геле от 100 до 800 млн. По всей видимости, тромбоцитарные факторы в составе такого геля оказываются инкорпорированы внутрь своеобразной матрицы, которая затрудняет их тотальный выход в суспензию, вследствие чего клетки в культуре испытывают воздействие материала не от 800 млн тромбоцитов с гранулами, а от гораздо меньшего их числа. Гель на основе аутологичной БоТП весьма эффективен при лечении хронических трофических ран, некоторых дефектов кости, однако и здесь критическую роль играет качество исходных тромбоцитов [12, 27, 38]. Кроме того, тромбоцитарный гель требует регулярной замены с периодичностью не реже семи суток, что легко осуществимо, если использование геля носит форму аппликаций [12]. Однако если гель помещают в толщу ткани (в первую очередь при лечении дефектов опорно-двигательного аппарата), то его замена представляется уже затруднительной. Для этих целей требуется использовать более стабильные и долгоживущие матрицы. Инкорпорирование компонентов тромбоцитов внутрь композитных структур, органических и неорганических матриц представляется весьма оправданным при создании биологических трансплантатов, часто комбинированных с диплоидными клетками. На сегодняшний такой подход применяют в основном для создания костных трансплантатов, в том числе с использованием методик трехмерной печати [30, 38, 40]. Несмотря на об-

надеживающие результаты экспериментов, эта техника требует еще значительной оптимизации.

Интересным является вопрос об изготовлении биотрансплантатов, насыщенных интактными тромбоцитами. С одной стороны, наличие в трансплантате биологически активных тромбоцитов увеличивает надежность выделения ими гранул. Если тромбоцитарные факторы находятся в растворенном виде, высока вероятность их быстрого вымывания и потери при нанесении на рану; если тромбоцитарные факторы инкорпорированы внутрь матрицы, они могут оказаться недостаточно аттрактивными для клеток организма и не произвести желаемого эффекта. В то же время наличие в биотрансплантате жизнеспособных тромбоцитов с гранулами при контакте с активирующим агентом в ране создаст направленный массовый выход биологически активных веществ. Однако нельзя забывать, что тромбоцит представляет собой клетку «одноразового» действия, которая после полной активации сразу переходит в состояние инактивации и уже не способна к функционированию. Кроме того, выброс гранул тромбоцитами *in vivo* всегда носит массовый характер, поскольку дегрануляция одной клетки автоматически приводит к дегрануляции большого числа тромбоцитов [24]. Таким образом, тромбоцит-насыщенные трансплантаты создадут первоначально большой приток биологически активных веществ в область раны, но без поддержки его в последующем. В норме дегрануляция тромбоцита занимает не больше одного часа [24, 32]; не исключено что этот процесс можно искусственно удлинить, то есть сделать так, чтобы не все гранулы выходили из клеток одновременно, или добиться поэтапной дегрануляции тромбоцитов из разных областей трансплантата (при которой сначала дегранулируют клетки на поверхности, затем клетки, лежащие глубже, и т.д.). Однако в любом случае последовательная, растянутая во времени дегрануляция тромбоцитов будет ограничена коротким сроком их жизни, который *in vivo* составляет 7–8 суток [32], а в лабораторных условиях значительно сокра-

щается [8–10]. Насыщать же повторно трансплантат тромбоцитами, когда он уже находится в ране, представляется проблематичным. Таким образом, на сегодняшнем этапе имеет смысл использовать тромбоцит-насыщенные биотрансплантаты для тех случаев, когда материал тромбоцитов способен давать быстрый эффект и есть возможность регулярной смены трансплантата. Это возможно при лечении обширных ран кожи, трофических язв, ожогов; кроме того, по нашим данным, однократное введение комбинаций коллагена и БоТП значительно ускоряет рост костной ткани и достаточно для восполнения экспериментальных тканевых дефектов [1, 27, 34]. Есть основания считать, что использование биотрансплантатов с живыми тромбоцитами откроет новые направления в регенеративной медицине.

Селекция качественных тромбоцитов

Уже неоднократно говорилось о важности отбора тромбоцитных доз с высоким уровнем функционально активных клеток [5, 10, 14, 19]. По нашим данным, значение $D_{тр.гр.}$ и в крови доноров, и в ТК обычно не превышает 74–75%; уровень $D_{тр.гр.}$ свыше 80% наблюдается только у некоторых пациентов, в первую очередь на пике тромботических осложнений [17]. Опыт показывает, что тромбоцитные дозы с нормальным значением $D_{тр.гр.}$ (35–75%) эффективны не только в трансфузиологии, но и при решении других клинических задач [1, 3, 12]. Вместе с тем может возникнуть ситуация, когда наличие биологически неполноценных тромбоцитов (лишенных гранул, функционально неактивных) будет мешать эффективному применению БоТП в регенеративной медицине. Удалять тромбоциты без гранул из готовых доз БоТП или ТК на базе трансфузиологических отделений на сегодняшний день не представляется возможным. Использование проточных сортиров (системы MoFlo) позволяет разделить тромбоциты с гранулами и без гранул на две отдельные фракции, однако это требует предварительного витального окрашивания, что может оказаться неприемлемым для даль-

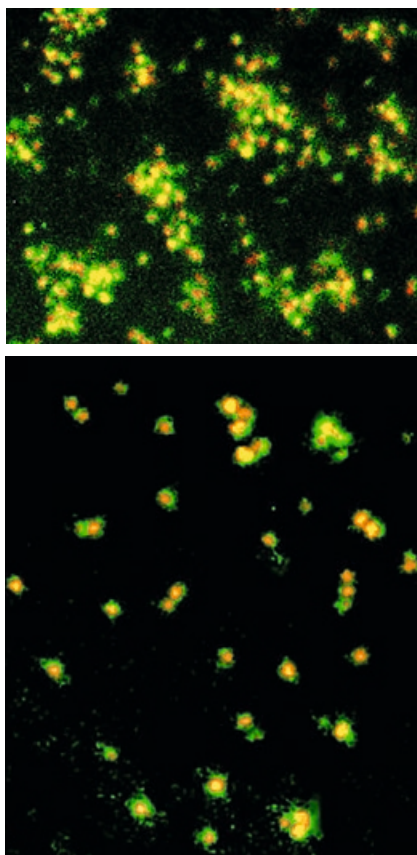


Рисунок 2. Селективное выделение тромбоцитов с гранулами: а) тромбоциты с гранулами, адгезирующие на стеклянных бусинах в присутствии наночастиц серебра; б) тромбоциты с гранулами после отделения от бусин. Витальная окраска трипафлавином и акридиновым оранжевым. Увеличение: 400х.

нейшего клинического использования тромбоцитов. Кроме того, разделение тромбоцитов на сортере MoFlo часто сопровождается их спонтанной дегрануляцией. Более эффективной представляется технология разделения тромбоцитов, основанная на их адгезии. При контакте БоТП с субстратом тромбоциты с гранулами адгезируют, тогда как тромбоциты без гранул останутся в суспензии. Удаление биологически полноценных тромбоцитов с адгезивного субстрата можно проводить с помощью протеаз или хелатирующих агентов, при этом нужно учитывать, что дегрануляция начинается уже через 10–15 минут после контакта тромбоцита с субстратом. В настоящее время в НИИ скорой помощи имени Н. В. Склифосовского ведутся работы по изучению способов стабилизации адгезирующих тромбоцитов, то есть блокировки их на ранней стадии адгезии, препятствующей

дегрануляции. На сегодняшний день нами отработаны методики по стабилизации тромбоцитов с помощью антиагреганта тикагрелора и наночастиц серебра (рис. 2); ведется работа по исследованию возможности с помощью наносеребра вызывать избирательную дегрануляцию тромбоцитов, то есть выделение ими гранул лишь с определенными веществами. Это направление в клеточных технологиях пока отсутствует, однако есть основания считать избирательную дегрануляцию тромбоцитов возможной. Показано, что внутри одного тромбоцита гранулы могут отличаться по химическому составу и скорости выхода из клетки в процессе активации [24]. Не исключено, что стабилизация и избирательная дегрануляция тромбоцитов позволит получать суспензии, обогащенные определенным набором биологически активных веществ. Это создаст возможность на основе одного и того же материала (БоТП) получать разнотипные лекарственные формы.

Тромбоциты человека являются многофункциональными клетками, но при этом имеют лишь один физиологический способ реализации своих репаративных функций, который напрямую связан с гранулами и дегрануляцией. Это создает определенную сложность в выборе адекватной тактики лечения тканевых дефектов с помощью тромбоцитов. Вместе с тем не вызывает сомнений, что тромбоциты являются очень ценным и перспективным объектом для решения многих медико-биологических задач.

Список литературы

1. Ваза А. Ю., Макаров М. С., Сластинин В. В., Боровкова Н. В., Ключвин И. Ю., Похитонов Д. Ю., Пономарев И. Н. Эффективность комбинации аллогенной богатой тромбоцитами плазмы с коллагеном при лечении дефектов бедренной кости у крыс // Трансплантология. — 2016. — № 2. — С. 36–44.
2. Высочин И. В., Кобзева Е. Н. Криоконсервирование тромбоцитов. Технологические подходы замораживания и методы контроля качества (обзор литературы) // Трансфузиология. — 2012. — № 4, Т. 13. — С. 31–41.
3. Высочин И. В., Макаров М. С., Кобзева Е. Н. Влияние технологии инактивации патогенов на качество клеток тромбоцитных концентратов // Вестник гематологии. — 2016. — Т. 12, № 4. — С. 32–33.

4. Губанова М. Н., Мадзаев С. Р., Жибурт Е. Б. Распространенность и встречаемость инфекций у доноров крови в России // Вопросы вирусологии. — 2015. — Т. 60, № 6. — С. 29–31.
5. Жибурт Е. Б., Коденев А. Т., Ващенко Г. А., Капустов В. И. Совершенствование получения концентрата тромбоцитов // Вестник службы крови России. — 2010. — № 2. — С. 22–25.
6. Жибурт Е. Б. Переливание крови: новые возможности // Поликлиника. — 2015. — № 7. — С. 93–96.
7. Макаров М. С., Боровкова Н. В., Кобзева Е. Н., Высочин И. В., Хватов В. Б. Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека и его применение в клинической практике // Медицинский Алфавит. Современная лаборатория. — 2012. — № 3. — С. 32–34.
8. Макаров М. С., Кобзева Е. Н., Высочин И. В., Боровкова Н. В., Хватов В. Б. Применение витального окрашивания для морфофункционального анализа тромбоцитов человека короткого хранения // Альманах клинической медицины. — 2014. — № 30. — С. 83–87.
9. Макаров М. С., Боровкова Н. В., Хватов В. Б., Кобзева Е. Н. Влияние центрифугирования на биологическую полноценность тромбоцитов человека // Вестник службы крови России. — 2015. — № 1. — С. 41–44.
10. Макаров М. С. Влияние высоких концентраций диметилсульфоксида на биологическую активность тромбоцитов человека в плазме // Медицинский Алфавит. Современная лаборатория. — 2016. — № 2. — С. 48–52.
11. Накастоев И. М., Грачев А. Е., Гемджян Э. Г., Цыба Н. Н., Журавлев В. В., Кречетова А. В., Кастрикина И. С., Ватагина Е. А., Рыжко В. В., Городецкий В. М. Клиническая эффективность переливаний концентратов тромбоцитов, подвергнутых инактивации патогенов // Терапевтический архив. — 2013. — Т. 85, № 8. — С. 77–80.
12. Оболенский В. Н., Ермолова Д. А., Макаров М. С., Конюшко О. И., Сторожева М. В., Боровкова Н. В., Лаберко Л. А., Семенова Т. В. Стимуляция регенераторных процессов в хронических ранах с помощью богатой тромбоцитами плазмы // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б. В. Петровского. — 2016. — № 1. — С. 38–43.
13. Огородникова М. Д., Заботина Т. Н., Борунова А. А., Очеева Н. Ю., Кадагидзе З. Г., Рукавицын О. А. Влияние фотохимической обработки и гамма-облучения на экспрессию маркеров активации и апоптоза тромбоцитов // Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. — 2011. — Т. 10, № 1. — С. 15–20.
14. Потапский В. М., Неминущая Е. И. Алгоритм активизации донорского движения среди студентов и курсантов учебных заведений Москвы // Трансфузиология. — 2011. — Т. 12, № 3. — С. 4–16.
15. Руководство по приготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови/ Европейский комитет по переливанию крови. — 16 изд. — Нанси (Франция): Bialec. — 2010. — 490 с.
16. Сегреева Н. С., Шанский Я. Д., Свиридова И. К., Кирсанова В. А., Ахмедова С. А., Кувшинова Е. А., Мейснер И. С. Биологические эффекты тромбocyтарного лизата при добавлении в среду культивирования клеток человека // Гены и клетки. — 2014. — Т. 9, № 1. — С. 77–85.
17. Хватов В. Б., Макаров М. С., Боровкова Н. В. Морфологическая оценка адгезивной активности тромбоцитов с помощью витального окрашивания // Клиническая лабораторная диагностика. — 2013. — № 7. — С. 58–61.
18. Amable P. R., Carias R. B., Teixeira M. V., da Cruz Pacheco I., Correa do Amaral R. J., Granjeiro J. M., Borojevic R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors // Stem Cell Res. Ther. — 2013. — Vol. 4, № 3. — P. 67.
19. Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurden P., Nurden A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration // Thromb. Haemost. — 2004. — Vol. 91, № 1. — P. 4–15.
20. Civinini R., Macera A., Nistri L., Redl B., Innocenti M. The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration // Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism. — 2011. — Vol. 8, № 1. — P. 25–31.
21. Copland I. B., Garcia M. A., Waller E. K., Roback J. D., Galipeau J. The effect of platelet lysate fibrinogen on the functionality of MSCs in immunotherapy // Biomaterials. — 2013. — Vol. 34, № 32. — P. 7840–7850.
22. Freire V., Andollo N., Etxebarria J., Durán J. A., Morales M. C. In vitro effects of three blood derivatives on human corneal epithelial cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2012. — Vol. 53, № 9. — P. 5571–5578.
23. Golebiewska E. M., Poole A. W. Secrets of platelet exocytosis — what do we really know about platelet secretion mechanisms? // Br. J. Haematol. — 2014. — Vol. 165, № 2. — P. 204–216.
24. Italiano J. E., Richardson J. L., Patel-Hett S., Battinelli E., Zaslavsky A., Short S., Ryeom S., Folkman J., Klement G. L. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: Pro- and anti-angiogenic proteins are organized into separate platelet {alpha}-granules and differential released // Blood. — 2008. — Vol. 111, № 3. — P. 1227–1233.
25. Keil S. D., Bengrine A., Bowen R., Marschner S., Hovenga N., Rouse L., Gilmour D., Duverlie G., Goodrich R. P. Inactivation of viruses in platelet and plasma products using a riboflavin-and-UV-based photochemical treatment // Transfusion. — 2015. — Vol. 55, № 7. — P. 1736–1744.
26. Lannan K. L., Sahler J., Kim N., Spinelli S. L., Maggior S. B., Garraud O., Cognasse F., Blumberg N., Phipps R. P. Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles // Front. Immunol. — 2015. — Vol. 6. — P. 48.
27. Malhotra A., Pelletier M., Oliver R., Christou C., Walsh W. R. Platelet-rich plasma and bone defect healing // Tissue Eng. Part A. — 2014. — Vol. 20, № 19–20. — P. 2614–2633.
28. Martínez C. E., Smith P. C., Palma Alvarado V. A. The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update // Front Physiol. — 2015. — Vol. 6. — P. 290.
29. Mazzocca A. D., McCarthy M. B., Chowanec D. M., Dugdale E. M., Hansen D., Cote M. P., Bradley J. P., Romeo A. A., Arciero R. A., Beitzel K. The positive effects of different platelet-rich plasma methods on human muscle, bone, and tendon cells // Am. J. Sports Med. — 2012. — Vol. 40, № 8. — P. 1742–1749.
30. Mehta S., Watson J. T. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications // J Orthop Trauma. — 2008. — Vol. 22, № 6. — P. 432–438.
31. Mishra A., Tummala P., King A., Lee B., Kraus M., Tse V., Jacobs C. R. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation // Tissue Eng. Part C. Methods. — 2009. — Vol. 15, № 3. — P. 431–435.
32. Michelson A. D. Platelets. 3rd ed. — Amsterdam: Academic Press, 2013. 1351 p.
33. Nomura S., Ozaki Y., Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings // Thromb Res. — 2008. — Vol. 123, № 1. — P. 8–23.
34. Oktay A. O., Demiralp B., Demiralp B. Effects of platelet rich plasma and chitosan combination on bone regeneration in experimental rabbit cranial defects // The Journal of Oral Implantology. — 2010. — Vol. 36, № 3. — P. 175–184.
35. Pelttari K., Winter A., Steck E., Goetzke K., Henig T., Ochs B. G., Aigner T., Richter W. Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice // Arthritis Rheum. — 2006. — Vol. 54, № 10. — P. 3254–3266.
36. Ramsey G. Hemostatic efficacy of pathogen-inactivated blood components // Semin. Thromb. Hemost. — 2016. — Vol. 42, № 2. — P. 172–182.
37. Ranly A. M., McMillan J., Keller T. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation: a study of immunocompromised mice // Journal of Bone and Joint Surgery A. — 2005. — Vol. 87, № 9. — P. 2052–2064.
38. Roy S., Driggs J., Elgharably H., Biswas S., Findley M., Khanna S., Gnyawali U., Bergdall V. K., Sen C. K. Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation // Wound Repair Regen. — 2011. — Vol. 19, № 6. — P. 753–766.
39. Van Aelst B., Feys H. B., Devloo R., Vanhoorelbeke K., Vandekerckhove P., Compennolle V. Riboflavin and amotosalen photochemical treatments of platelet concentrates reduce thrombus formation kinetics in vitro // Vox Sang. — 2015. — Vol. 108, № 4. — P. 328–339.
40. Yun J. H., Han S. H., Choi S. H. Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration for osseointegration of dental implants: preliminary study in canine three-wall intrabony defects // J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. — 2014. — Vol. 102, № 5. — P. 1021–1030.





*Точная диагностика -
эффективное лечение!*

ВЕКТОР-БЕСТ для Вашей лаборатории

Комплексные решения для эффективной
организации лабораторных исследований
методами **ИФА, Real-time ПЦР,**
клинической биохимии



**Наборы
реагентов
Контрольные
материалы**



**Оборудование
Расходные
материалы
Сервисное
сопровождение**



**Консультации
Обучение
Методическая
литература**

АО «Вектор-Бест»

630117, Новосибирск, а/я 492

т/ф: (383) 227-73-60, 332-81-34

vbmarket@vector-best.ru

www.vector-best.ru



Окислительная модификация белков и показатели антиоксидантной защиты при острой алкогольной интоксикации

Н. А. Терехина, д.м.н., проф., зав. кафедрой биохимии¹

Е. В. Жидко, аспирант кафедры биохимии¹

Г. А. Терехин, д.м.н., проф., зав. кафедрой экстремальной медицины и товароведения²

О. Г. Горячева, к.м.н., врач-терапевт³



Н. А. Терехина

¹Кафедра биохимии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь

²ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, г. Пермь

³ООО «Уралмед», г. Пермь

Oxidative modification of proteins and indicators of antioxidant protection in acute alcohol intoxication

N. A. Teryokhina, E. V. Zhidko, G. A. Teryokhin, O. G. Goryacheva

Perm State Medical University n.a. E. A. Wagner, Perm State Pharmaceutical Academy, Uralmed Co.; Perm, Russia

Резюме

При остром отравлении этанолом в эритроцитах крови больных усиливается окислительная модификация белков и снижается содержание глутатиона, в плазме крови наблюдается достоверное снижение содержания трансферрина и церулоплазмينا. Глутатион и белки-антиоксиданты церулоплазмин и трансферрин являются мишенями для действия этанола.

Ключевые слова: показатели антиоксидантной защиты, острое отравление этанолом.

Summary

In acute ethanol intoxication in erythrocytes of patients oxidative modification of proteins is enhanced and glutathione content is reduced, in blood plasma observed a significant decrease in the content of transferrin and ceruloplasmin. Glutathion and proteins antioxidants ceruloplasmin and transferrin are targets for the action of ethanol.

Key words: indicators of antioxidant protection, acute alcohol intoxication.

Окислительному стрессу принадлежит ведущая роль в формировании цитотоксических эффектов этанола [3, 8]. Показатели оксидантной защиты являются чувствительными к действию ксенобиотиков [1, 7]. В эксперименте на крысах показано, что при острой алкогольной интоксикации уменьшается проницаемость эритроцитарных мембран, увеличивается уровень карбонильных производных белков, повышается содержание глутатиона в эритроцитах и церулоплазмينا в плазме крови, снижается уровень трансферрина [7, 9, 10]. Наличие хронического поражения органов и систем из-за длительного употребления этанола значительно отягощает течение, влияя на исход острого отравления этанолом [6]. В патогенезе алкогольной болезни печени важную роль играют окислительный стресс, и дальнейшая разработка патогенетической лекарственной терапии заболевания, прежде всего направленной

на коррекцию состояния эндогенной антиоксидантной системы экзогенными антиоксидантами, является актуальной задачей [8].

Цель работы: оценить окислительную модификацию белков и показатели антиоксидантной защиты в эритроцитах и плазме крови больных при острой алкогольной интоксикации.

Материалы и методы

Объектом исследования служила периферическая кровь 25 больных с острым отравлением этанолом. В качестве контроля использовали кровь 15 здоровых людей. Кровь центрифугировали при 3000 оборотах в минуту в течение 10 минут. После удаления плазмы крови в пробирку с оставшейся эритроцитарной массой добавляли физиологический раствор, перемешивали и центрифугировали вновь, затем удаляли надосадочную жидкость. Процедуру отмывания эри-

троцитов физиологическим раствором повторяли трижды. В отмытых эритроцитах периферической крови спектрофотометрически определяли содержание восстановленного глутатиона по методу [11] и карбонильных производных белков по [4]. Метод оценки окислительной модификации белков основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидрозином с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразонов. В плазме периферической крови определяли содержание церулоплазмينا по методу [5] и трансферрина по [12]. Математическую обработку результатов исследования выполняли на компьютере с применением программы Statistica 10.0 и пакета Microsoft Office 2007.

Результаты и обсуждения

В гемолизате эритроцитов крови больных при остром отравлении этанолом содержание карбонильных

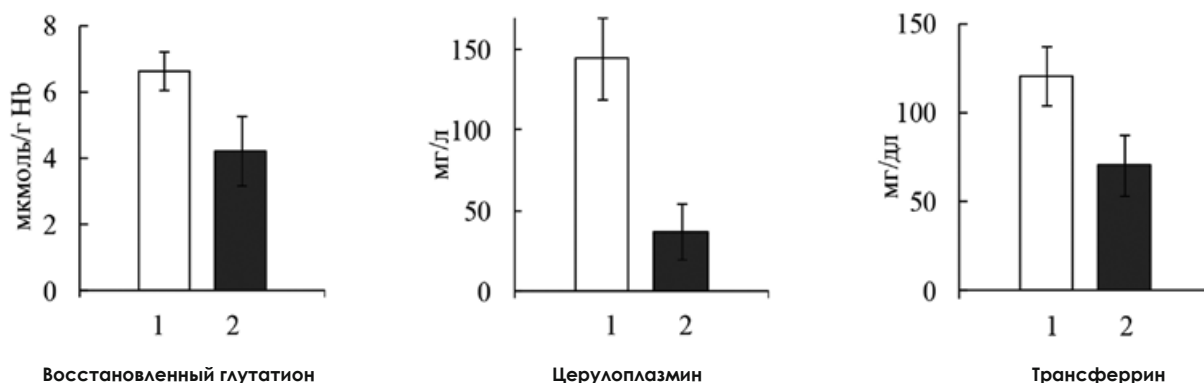


Рисунок 1. Содержание глутатиона и белков-антиоксидантов в периферической крови больных при острой алкогольной интоксикации. По оси абсцисс: 1 — здоровые люди, 2 — больные с острой алкогольной интоксикацией.

производных белков достоверно повышается ($1,32 \pm 0,35$ ммоль/мл эритроцитов) по сравнению со здоровыми людьми ($5,35 \pm 1,61$ ммоль/мл эритроцитов), что свидетельствует об усилении окислительной модификации белков.

Особое место в антиоксидантной защите организма занимает система глутатиона, которая является естественной цитопротекторной системой в условиях острых интоксикаций [2]. Содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах крови здоровых людей оказалось равным ($6,63 \pm 0,59$ мкмоль/г Нб). В эритроцитах крови больных при острой алкогольной интоксикации содержание этого антиоксиданта достоверно снижается (рис. 1).

В основе нарушений обмена глутатиона лежит реализация цитотоксических эффектов действия этанола [2]. Срыв функциональных возможностей системы глутатиона связан с истощением запасов этого антиоксиданта при осуществлении глутатионовой конъюгации, нарушением энергетического метаболизма тканей и угнетением детоксикационной функции печени.

При остром отравлении этанолом снижается содержание основного антиоксиданта плазмы крови церулоплазмина в четыре раза, а содержание другого белка-антиоксиданта трансферрина почти в два раза по сравнению с группой здоровых лиц (рис. 1). В плазме крови церулоплазмин совместно с трансферрином образует антиоксидантную систему, регулирующую концентрацию восстановленных ионов железа. Синтезирующая функция печени при остром отравлении этанолом нарушается, и содержание

белков-антиоксидантов церулоплазмина и трансферрина в плазме периферической крови снижается.

Известно, что в сыворотке крови больных алкоголизмом концентрация церулоплазмина снижается, при алкогольной зависимости менее 12 лет и при ремиссии уровень церулоплазмина повышается, не достигая контрольных значений, а более длительное злоупотребление приводит к дальнейшему угнетению синтеза белка.

Таким образом, при остром отравлении этанолом в эритроцитах крови больных усиливается окислительная модификация белков и снижается уровень восстановленного глутатиона, в плазме крови наблюдается достоверное снижение содержания белков-антиоксидантов церулоплазмина и трансферрина.

Выводы

При острой алкогольной интоксикации в эритроцитах периферической крови больных усиливается окислительная модификация белков. Глутатион и белки-антиоксиданты церулоплазмин и трансферрин являются мишенью для действия этанола.

Список литературы

1. Высокогорский В.Е. Нарушение обмена глутатиона при алкоголизме / В.Е. Высокогорский, Е.С. Ефременко, Д.Е. Быков, Жукова, Г.А. Лопухов // Омский научный вестник. — 2011. — № 1. — С. 9–12.
2. Глушков С.И. Система глутатиона как естественная цитопротекторная система в условиях острых интоксикаций / С.И. Глушков, С.А. Куценко // Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты. СПб.: ООО «Издательство Фолиант». — 2004. — С. 67–68.
3. Долго-Сабуров В.Б. Роль окислительного стресса в формировании цитотоксических эффектов этанола / В.Б. Долго-Са-

буров, А.Н. Петров, В.А. Беляев // Токсикологический вестник. — 2010. — № 1. — С. 6–10.

4. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты. — СПб.: издательство «Медицинская пресса», 2006. — С. 272–273.
5. Камышников В.С. Клиничко-биохимическая лабораторная диагностика: справочник: в 2 т. / В.С. Камышников. — Минск: Интерпрессервис, 2003. — Т. 2. — С. 463.
6. Ливанов Г.А. Метаболические нарушения у больных с острыми отравлениями этанолом на фоне хронического алкоголизма и пути их фармакологической коррекции / Г.А. Ливанов, А.Н. Лодыгин, С.В. Лубсанова, А.Л. Коваленко, Б.В. Батоцыренов, О.А. Сергеев, А.Т. Лоладзе, А.Ю. Андрианов // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2015. — Т. 115, № 4–2. — С. 64–68.
7. Орбиданс А.Г. Экспериментальное обоснование использования энтеросорбентов при остром отравлении этанолом / А.Г. Орбиданс, Г.А. Терехин, Е.В. Владимирский, Н.А. Терехина // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2009. — № 4. — С. 29–30.
8. Панченко Л.Ф. Окислительный стресс при алкогольной болезни печени / Л.Ф. Панченко, Б.В. Давыдов, Н.Н. Терехина, В.Ю. Баронец, А.С. Журавлева // Биомедицинская химия. 2013. Т. 59, № 4. С. 452–458.
9. Терехина Н.А. Показатели системы глутатиона и ферменты холестаза при острой алкогольной интоксикации / Н.А. Терехина, Е.В. Жидко, Г.А. Терехин, А.Г. Орбиданс // Пермский медицинский журнал. — 2016. — Т. 33, № 4. — С. 73–77.
10. Терехина Н.А. Влияние сорбентов на содержание меди, железа и транспортирующих их белков при алкогольной интоксикации / Н.А. Терехина, Е.В. Жидко, Г.А. Терехин, А.Г. Орбиданс // Казанский медицинский журнал. — 2015. — № 5. — С. 868–871.
11. Beutler E. Red cell metabolism a manual of biochemical methods. Grune & Stratton, Orlando 1990. — P. 131–134.
12. Dati F. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM 470) / F. Dati, G. Schumann, L. Thomas // Eur J Clin Chem Clin Biochem. — 1996. — Vol. 34, № 6. — P. 517–520.



Практика реализации требований ISO 15189:2012 (ГОСТ Р ИСО 15189–2015) по управлению субподрядными лабораториями. Часть 2*

А. В. Каленская¹; А. В. Эмануэль, к.т.н.²; Е. В. Аверьянова²; Г. А. Иванов, к.м.н.³; Т. А. Окша⁴; В. Н. Кустова⁵

¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва

²ГБУЗ «Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента» Департамента здравоохранения г. Москвы

³ФГБУ «Консультативно-диагностический центр с поликлиникой» Управления делами Президента России, г. Санкт-Петербург

⁴ООО «Био-Рад лабораторис», г. Москва

⁵ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологии имени Д. И. Менделеева», г. Санкт-Петербург

Practice of implementing requirements of ISO 15189:2012 (GOST R ISO 15189–2015) for subcontracting laboratories management. Part 2

A. V. Kalenskaya, A. V. Emanuel, E. V. Averyanova, G. A. Ivanov, T. A. Oksha, V. N. Kustova

Central Scientific and Research Institute for Epidemiology, Moscow; Scientific and Research Institute of Public Health Service and Medical Management, Moscow; Consultative and Diagnostic Centre with Polyclinic of the Administration of the President of the Russian Federation, Saint Petersburg; Bio-Rad Laboratories Co., Moscow; All-Russian Scientific Research Institute for Metrology n.a. D.I. Mendeleev, Saint Petersburg; Russia

Резюме

В настоящей статье рассмотрены инструменты комплексной оценки субподрядных лабораторий в соответствии с требованием стандарта ISO 15189. Представлены конкретные примеры планов и отчетов по оценке лабораторий-субподрядчиков. Инструменты, приведенные в настоящей статье, могут использоваться медицинскими организациями и медицинскими лабораториями в качестве шаблонов для разработки собственных процедур, соответствующих их потребностям.

Ключевые слова: субподрядная лаборатория, ISO 15189.

Summary

The article describes practicable elements for comprehensive on-going assessment of referral laboratory performance to fulfill ISO 15189 requirements. Specific plan and report examples can be used as baseline guidelines to establish, document and implement laboratory's individual procedures in accordance with laboratory's in-house demands.

Key words: referral laboratory, reference laboratory, ISO 15189.

В настоящей статье рассмотрены вопросы взаимодействия с субподрядными лабораториями. Ожидается, что взаимодействие основной (базовой) и субподрядной лабораторий юридически оформлено, то есть заключены договор, контракт, или существует любой другой юридически корректный документ, регламентирующий их взаимодействие.

Субподрядной лабораторией в рамках данной статьи будет именоваться лаборатория, в которую направляются пробы биоматериала пациентов для проведения исследований, не выполняемых лабораторией-заказчиком на собственной лабораторной базе. Субподрядная лаборатория (referral laboratory)

в данном контексте является синонимом термина «вспомогательная лаборатория».

Напомним, что стандарт ISO 15189:2012 (ГОСТ Р ИСО 15189–2015) требует специального управления субподрядными лабораториями (см. пункт стандарта 4.5).

Как правило, базовая лаборатория, направляющая пробы в сторонние лаборатории для проведения исследований, ограничивается первичной оценкой субподрядной лабораторий, по результатам которой заключается договор, тем самым требования стандарта ISO 15189 считаются выполненными. Вопросы выбора и первичной оценки субподрядных лабораторий были подробно рассмотрены в первой части настоящей работы.

Тем не менее указанный стандарт однозначно требует периодического пересмотра и оценки взаимоотношений с лабораторией-субподрядчиком для обеспечения соответствия определенным разделам документа (п. 4.5 ISO 15189).

Ответственность за оценку работы субподрядных лабораторий несет заведующий лабораторией. Естественно, непосредственная техническая работа может быть делегирована другим сотрудникам, но итоговая ответственность в любом случае всей полнотой лежит на заведующем лабораторией-заказчиком. Данная ответственность регламентирована большинством международных, национальных стандартов и руководящих

*Часть 1 читайте в «Медицинский алфавит №20/2017, том №2. Современная лаборатория»

Таблица 1
Реестр субподрядных лабораторий

Наименование лабораторий	Наименование услуги	Количество заказанных услуг	Срок выполнения	Стоимость	Методика	Регистрационное удостоверение на оборудование, реагенты	CV	ВЛК	ВОК	Способ передачи результатов

указаний для медицинских лабораторий. В частности, в стандарте ISO 15189 данное требование закреплено в п. 1.1.4 i: «Заведующий лабораторией должен выбирать вспомогательные лаборатории и мониторировать качество их услуг». Аналогичные требования установлены в аккредитационных документах CAP (College of American Patologists), предписывающих заведующему лабораторией выбирать и мониторировать субподрядные лаборатории, а также в требованиях к аккредитации медицинских лабораторий CPA (Clinical Phatology Accreditation [UK]), устанавливающих ответственность заведующего лабораторией за определение и внедрение процедур по субподряду медицинских услуг.

Руководствуясь требованиями стандарта ISO 15189 и аналогичных ему, лаборатория должна разработать документированные процедуры выбора и оценки вспомогательных лабораторий, вести реестр всех субподрядных лабораторий, учитывать все пробы, направляемые в субподрядные лаборатории, и сохранять направления и результаты проведенных исследований в течение заранее определенного периода времени.

Аналогичные требования устанавливает также п. 5.5.2.5 «Приобретение и использование услуг субподрядных лабораторий» руководства GP26-A4 'Quality Management System Model for Laboratory Services — Fourth Edition — Approved Guideline' (Clinical Laboratory Standards Institution, CLSI) и подробно раскрывает стандарт QMS 05-A2 (ранее GP09-A2) 'Quality management systems: qualifying, selecting and evaluating a referral laboratory — Second Edition — Approved Guideline' (CLSI).

В соответствии со ст. 706 ГК РФ всю полноту ответственности за выполнение исследования перед пациентом несет лаборатория-заказ-

чик. Ответственность предполагает разработку комплекса мероприятий с целью подтверждения способности субподрядной лаборатории выполнять исследования в соответствии с требованиями лаборатории-заказчика в течение всего срока действия заключенного договора.

Немаловажным аспектом является и удобство работы с субподрядной лабораторией, а также эффективность, то есть экономическая составляющая взаимодействия, так как одной из возможных причин направления проб в субподрядные лаборатории являются инициативы по сокращению издержек базовой лаборатории (так называемые cost-saving initiatives).

Таким образом, ключевые направления оценки субподрядной лаборатории можно объединить в три тематических блока:

- оценка качества выполняемых исследований;
- оценка сервисной составляющей;
- оценка экономической эффективности.

Планирование контрольных мероприятий для оценки качества выполняемых исследований

Входными данными для планирования контрольных мероприятий являются реестры действующих субподрядных лабораторий с указанием перечня исследований, направляемых в каждую из них, их количества, сроков выполнения и стоимости, а также данных, полученных при первичной оценке. Базовой лаборатории необходимо утвердить форму такого реестра и соответствующим образом актуализировать его. Пример реестра представлен в табл. 1.

Для определения плана контрольных мероприятий следует провести комплексную оценку по каждому исследованию с учетом как минимум

следующих аспектов:

- сложности и степени автоматизации используемой методики;
- объема проводимых лабораторией-субподрядником процедур внутрилабораторного контроля качества;
- участия в системах внешней оценки качества и его результатов;
- участия в межлабораторных сличениях и их результатов;
- способа ввода назначений и результатов в лабораторную информационную систему;
- способа передачи результатов базовой лаборатории (бумажный носитель, электронная почта, интеграция).

Крайне важно для определения контрольных мероприятий и объема выборки ориентироваться на количество заказываемых исследований и их клиническую значимость. Очевидно, что чем меньше мероприятий по обеспечению качества исследований проводит субподрядная лаборатория, тем больше методов контроля должна использовать базовая лаборатория в отношении контроля качества запрашиваемых исследований.

В качестве базовых контрольных мероприятий авторы статьи предлагают использовать следующие:

- проверка правоустанавливающей документации;
- рутинный контроль работы;
- выборочная проверка бланков результатов;
- внутрилабораторная и внешняя системы оценки качества;
- лабораторный аудит;
- анализ претензий;
- выездной аудит

Выбранные контрольные мероприятия рекомендуется оформить в виде плана с указанием лиц, ответственных за их выполнение. Пример плана представлен в табл. 2.

Таблица 2

Наименование лаборатории	Наименование услуги	Метод контроля	Выборка	Ответственный	Периодичность	Стоимость контрольных мероприятий

При планировании важно также учитывать экономическую составляющую, чтобы стоимость контрольных мероприятий была соразмерна объему и стоимости запрашиваемых исследований.

Проверка правоустанавливающей документации

Для выполнения законодательных требований к оказанию медицинских услуг рекомендуется проводить проверку действительности лицензии субподрядной лаборатории на осуществление медицинской деятельности в Едином реестре лицензий (www.roszdravnadzor.ru/services/licenses) и актуальности регистрационных удостоверений в Государственном реестре медицинских изделий (www.roszdravnadzor.ru/services/misearch), размещенных на официальном сайте Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения.

Проверку правоустанавливающей документации особо важно проводить в тех случаях, когда первоначально при заключении договора не предполагалось направлять пробы для выполнения всего перечня исследований, включенного в договор, что бывает в случаях заключения до-

говора для подстраховки лаборатории-заказчика в чрезвычайных или иных аналогичных ситуациях, когда рутинная деятельность становится невозможна.

Кроме того, контролю также подлежат регистрационные удостоверения на реагенты и оборудование с ограниченным сроком действия.

Также известны случаи отзыва бес-
срочных регистрационных удостове-
рений и недобросовестные действия
субподрядных лабораторий в части
предоставления заведомо ложной
документации.

Рутинный контроль

Ответственность за предоставление заказчику результата исследования, выполненного в субподрядной лаборатории, несет базовая лаборатория. В этой связи авторы статьи рекомендуют проводить проверку бланков результатов субподрядной лаборатории до их передачи конечному заказчику.

Оценке подлежит как минимум следующее:

- наличие и соответствие всех персональных и клинических данных пациента в бланке результата данных, указанным в направлении;

- соответствие перечня выполненных исследований запрашиваемым;
- соответствие типа биоматериала, указанного на бланке результатов, заказанному исследованию (особенно актуально для цитологических и патоморфологических исследований);
- соответствие единиц измерения и пределов референсных значений;
- соблюдение сроков выполнения исследований.

Каждое несоответствие должно быть зарегистрировано и учтено при проведении итоговой оценки качества работы субподрядной лаборатории.

Выборочная проверка бланков результатов

При большом объеме исследований, передаваемых в субподрядную лабораторию, базовая лаборатория не всегда может проводить тотальную проверку всех бланков результатов, полученных от субподрядной лаборатории. В этом случае рекомендуется проводить выборочную проверку бланков результатов с целью их комплексной оценки. К проведению

Таблица 3

№ пробы	Персональные данные		Услуга		Срок исполнения		Единицы измерения		Биоматериал		Интерпретация результатов		
	Бланк заказа	Бланк результата	Бланк заказа	Бланк результата	Договор	Факт	Договор (заведены в ЛИС)	Бланк результата	Бланк заказа	Бланк результата	Договор (заведены в ЛИС)	Референсные значения	Комментарии
Корректирующие действия													

Таблица 4
Результаты лабораторного аудита

Услуга	Исполнитель	Тип контрольного материала	Номер контрольной пробы	Дата отправки	Результаты исследования	Интерпретация результатов	Заключение

такой оценки рекомендуется привлекать специалистов, имеющих опыт в данной области исследований. Для получения объективных свидетельств данные оценки следует фиксировать в форме, аналогичной представленной в табл. 3.

Объем выборки и периодичность контроля определяются, исходя из объема заказываемых услуг, степени автоматизации оформления назначений и выдачи результатов (наличие интеграции лабораторных информационных систем заказчика и исполнителя), наличия или отсутствия претензий в отношении запрашиваемых услуг.

Выборочная оценка бланков результатов позволяет, помимо прочего, выявлять проблемы коммуникации между лабораторией-заказчиком и лабораторией-исполнителем. В частности, субподрядная лаборатория обязана уведомлять базовую лабораторию о любых изменениях в методике проведения исследований, как то: единицы измерения, пределы референсных значений и т.д., что на практике не всегда оказывается реализовано. В том случае, когда базовая лаборатория осуществляет печать и выдачу результатов исследований, проведенных в субподрядной лаборатории, из своей лабораторной информационной системы, смена единиц измерения либо пределов референсных значений требует дополнительных настроек в ЛИС базовой лаборатории. Выборочная проверка бланков результатов позволяет оперативно выявлять и решать данные проблемы.

Выявление систематического нарушения установленных сроков проведения исследований может свидетельствовать о проблемах с логистикой проб, и в таком случае необходимо провести оценку выполнения требований преаналитического этапа в отношении соблюдения временного и температурного интервалов достав-

ки биоматериала. Задержки на аналитическом этапе могут быть вызваны проблемами с поставкой реагентов, неудовлетворительными результатами контроля качества, выходом из строя оборудования либо могут быть обусловлены особенностями технологического процесса, предусматривающего постановку проб не каждый день. Последний случай предполагает проверку срока стабильности исследуемого аналита.

Каждый случай выявления несоответствия лаборатория-заказчик должна документировать, доводить до сведения лаборатории-субподрядчика, проводить анализ информации, представленной субподрядной лабораторией по данным случаям, учитывать при проведении итоговой оценки работы субподрядной лаборатории.

Внутрилабораторная и внешняя оценка качества

На этапе заключения договора с субподрядной лабораторией целесообразно установить требование предоставлять лаборатории-заказчику данные внутрилабораторного контроля и внешней оценки качества с установленной периодичностью.

Полученные данные внутрилабораторного контроля используются для оценки соответствия коэффициентов вариации и смещения предельно допустимым значениям и (или) биологически обоснованным нормам аналитической точности лабораторных исследований. При выявлении несоответствий установленным нормам следует запросить у лаборатории-субподрядчика журнал регистрации отбракованных результатов внутрилабораторного контроля качества согласно приложению № 4 Приказа МЗ РФ № 220, проанализировать предпринятые корректирующие действия. В случае признания корректирующих мероприятий неадекватными (не результативными),

должны быть использованы другие методы оценки, в том числе лабораторный или выездной аудит.

Лабораторный аудит

Лабораторный аудит проводится для тех исполнителей, которые не могут подтвердить проведение процедур внутрилабораторного контроля и (или) внешней оценки качества.

Лабораторный аудит осуществляется посредством исследования парных контрольных проб, проб с известным содержанием аналита, готовых контрольных материалов (могут быть использованы коммерческие контрольные материалы либо КМ внешней оценки качества).

Выбор контрольной пробы зависит от методики, наличия готовых контрольных материалов и их стоимости, возможности параллельного исследования этой же пробы в сторонней лаборатории либо на собственной лабораторной базе.

Контрольные пробы направляются в субподрядную лабораторию без уведомления лаборатории-субподрядчика вместе с пробами пациентов.

Полученные результаты контрольных измерений вносятся в отчет. Пример отчета представлен в табл. 4.

Анализ претензий

Стандарт ISO 15189 (п. 4.8) предписывает вести записи обо всех жалобах, их изучении и предпринятых действиях. Данное требование распространяется на все услуги, оказываемые лабораторией, в том числе выполняемые и в субподрядных лабораториях.

По запросу базовой лаборатории лаборатория-субподрядчик должна провести расследование и представить объективные свидетельства, позволяющие исключить либо подтвердить лабораторную ошибку, включая прослеживаемость результата до первичной пробы, направления, пригодность реагентов (сроки годности, РУ) и обо-

Таблица 5
Итоговая оценка субподрядной лаборатории

Критерий	Результаты оценки	Значение критерия
Соответствие правоустанавливающей документации	Да или нет	0 — да; 1 — нет
Аналитические характеристики метода исследования — CV (воспроизводимость)	Соответствие установленным нормам точности	0 — соответствует 1 — не соответствует, данные внутрилабораторного контроля качества не предоставлены
Соответствие назначения метода исследования заказываемой услуге	Да или нет	0 — да; 1 — нет
Учет результатов	Ручной или автоматизированный	0 — автоматизированный 1 — ручной
Результаты внешней оценки качества исследуемого анализа	Соответствие установленным нормам точности	0 — соответствует 1 — не соответствует, данные внутрилабораторного контроля качества не предоставлены
Количество несоответствий, выявленных в процессе выборочной или рутинной проверки бланков результатов	Количество несоответствий	0 — отсутствуют 1 — более одного
Результаты лабораторного аудита	Удовлетворительно или неудовлетворительно	0 — удовлетворительно или не проводился 1 — неудовлетворительно
Количество обоснованных претензий в отношении субподрядной лаборатории за отчетный период	Количество обоснованных претензий	0 — отсутствуют 1 — более одной
Результаты выездного аудита	Удовлетворительно или неудовлетворительно	0 — удовлетворительно или не проводился 1 — неудовлетворительно
Заключение:		

рудования (поверка, РУ) для проведения исследования, соответствие контрольных процедур.

Особое внимание следует уделить самой процедуре работы с жалобами, установленной в субподрядной лаборатории: определены ли сроки рассмотрения обращений, ответственные лица и т. д.

Выездной аудит

Аудит субподрядной лаборатории (аудит второй стороной) может быть инициирован при несоответствующих результатах вышеописанных методов оценки, когда лаборатории-заказчику необходимо убедиться в способности лаборатории соответствовать предъявляемым требованиям.

Важно, чтобы полученные в ходе аудита свидетельства были достаточны для обеспечения уверенности в прослеживаемости проб, достоверности и своевременности выдаваемых результатов в рамках выполнения заказываемых исследований. Проводить аудит всей системы менеджмента качества субподрядной лаборатории в данном контексте не представляется целесообразным.

Итоговая оценка

Итоговая оценка субподрядной лаборатории предусматривает совокупный анализ всех контрольных мероприятий в соответствии с заранее

установленными критериями. Может быть использована балльная система оценки, пример приведен в табл. 5.

Оценка сервисной составляющей и экономической эффективности

Как правило, большинство базовых лабораторий пользуются услугами большого количества внешних лабораторий. Такая практика, с одной стороны, оправдана, но может привести к дополнительным издержкам, в частности, на оплату транспортировки проб, проведения большого количества контрольных процедур, а также на оплату по базовому прейскуранту без применения системы скидок. Кроме того, различные варианты передачи результатов из субподрядных лабораторий (бумажные бланки, электронная почта) могут потребовать привлечения дополнительных трудовых ресурсов для проверки и ввода результатов в лабораторную информационную систему.

Лаборатория-субподрядчик, предлагающая информационную поддержку, удобную логистику проб, систему скидок в зависимости от заказываемых объемов, своевременное обеспечение (при необходимости) расходными материалами, является предпочтительной для выбора.

Обязательным условием сотрудничества с любой субподрядной

лабораторией является соблюдение принципа беспристрастности и исключение конфликта интересов лаборатории-заказчика и субподрядной лаборатории (п. 4.1.1.2 ISO 15189) с целью избежать отрицательного влияния на качество результатов и безопасность пациентов.

Выбирая между двумя равнозначными по уровню качества выполняемых исследований субподрядными лабораториями, предпочтение следует отдавать той, с которой базовая лаборатория сможет построить длительные партнерские отношения (принцип: менеджмент взаимоотношений). Долговременное сотрудничество предполагает возможность и целесообразность интеграции информационных систем для сокращения издержек обеих сторон, а также оптимизацию перечня исследований, выполняемых на базах обеих лабораторий.

Список литературы

1. ISO 15189:2012 Medical laboratories. Requirements for quality and competence.
2. GP26-A4. Quality management system model for laboratory services — Fourth edition. Approved Guideline.
3. QMS05-A2. Quality management systems: qualifying, selecting and evaluating a referral laboratory — Second Edition. Approved Guideline.
4. Sterling T. Bennett. Role and Responsibilities of the Laboratory Director.



Ерос System

Анализатор газов крови,
электролитов, метаболитов



- точные результаты у постели больного через 35 секунд
- использование технологии SMART CARD (измерительные карты со встроенным чипом биосенсоров)
- хранение измерительных карт при комнатной температуре
- длительные сроки годности измерительных карт
- эффективное использование расходных материалов — расход только в момент измерения
- минимизация возможности ошибки на стадии преданалитического этапа
- всегда откалиброван и готов к работе
- идентификация измерительных карт для гарантии качества и удобства хранения информации
- автоматическая калибровка и контроль качества системы
- беспроводная связь Wi-Fi и Bluetooth — широкие коммуникативные возможности
- значительное время работы от аккумуляторов без подзаряда системы
- возможность распечатать результаты на портативном или стационарном принтере

Изменяемый параметр	Ед. измерения	Диапазон измерения
pH	pH units	6,5–8,0
PCO2	mmHg	5–250
PO2	mmHg	5–750
Na	mmol/L	85–180
K	mmol/L	1,5–12
iCa	mmol/L	0,25–4
Glu	mg/dl	20–700
Lact	mmol/L	0,30–20,00
Hct	%PCV	10–75
Cl-	mmol/L	65–140
Crea	mg/dl	0,30–15,00

Расчетный параметр	Ед. измерения	Диапазон измерения
TCO	mmol/L	1–85
HCO3	mmol/L	1–85
BE efc	mmol/L	-30...+30
BE b	mmol/L	-30...+30
sO2	mmol/L	0–100
Hb	%	3.3–25
AGap	mmol/L	-14...+95
AGapK	mmol/L	-10...+99
eGFR	ml/min/1.73 м ²	2–60 или >60
eGFR-a	ml/min/1.73 м ²	2–60 или >60



МедСервис

115114 Россия, Москва, ул. Дербеневская, д. 20, стр. 32,
Т/П «Кожевники»

Телефон: +7 (495) 633-23-53

+7 (495) 633-24-34

Факс: +7 (495) 633-23-52

e-mail: office@medservice.biz

www.medservice.info



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

Epocal Inc
Manufacturing, R&D
2060 Walkey Road, Ottawa, ON K1G, 3P5
Phone: (613) 738-6192
www.epocal.com

Роль лабораторных исследований в системе эпидемиологического надзора за инфекциями

С. Г. Марданлы, д.м.н., проф. кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин¹, президент и директор по науке², акад. АМТН, заслуженный работник здравоохранения России

¹ГОУ ВО Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет» Минобразования Московской области, г. Орехово-Зуево

²ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская область



Role of laboratory research in the system of epidemiological surveillance of infections

S. G. Mardanly

State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuevo; ECOLab Co., Elektrogorsk; Moscow Region, Russia

Резюме

В статье рассмотрены основные проблемы при организации эпидемиологического надзора за инфекциями, и предлагаются пути их решения.

Ключевые слова: эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика.

Summary

The article considers the main problems in the organization of epidemiological surveillance of infectious diseases and suggests ways to address them.

Key words: epidemiological surveillance, laboratory diagnostics.

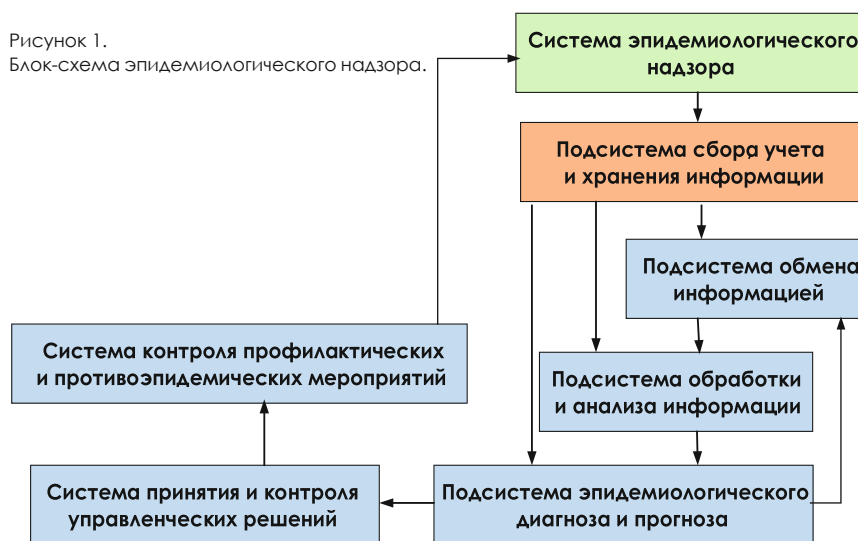
Эпидемиологический надзор представляет собой целый комплекс мероприятий, направленных на непрерывное слежение за эпидемическим процессом и его детерминантами с целью осуществления эпидемиологической диагностики, необходимой для принятия обоснованных управленческих решений по предупреждению возникновения и распространения инфекций. Данная процедура основана на непрерывном сборе, сопоставлении и анализе данных, своевременном распространении информации среди заинтересованных лиц с целью принятия определенных мер [1, 2, 3].

Основными задачами эпидемиологического надзора являются оценка распространенности инфекционных болезней и анализ их социально-экономической значимости [4].

Для достижения поставленных задач необходимо осуществить оценку эпидемиологического неблагополучия конкретных территорий, определить контингент лиц с повышенным риском заболевания, выявить причины и условия, определяющие наблюдаемый характер эпидемического процесса. Осуществление такой работы позволит разработать комплекс профилактических и противоэпидемических мероприятий [5, 6].

Осуществление контроля за выполнением профилактических и противоэпидемических мероприятий,

Рисунок 1.
Блок-схема эпидемиологического надзора.



а также оценка их эффективности позволяют осуществить прогнозирование дальнейшего развития эпидемиологической ситуации.

Комплекс мероприятий по осуществлению эпидемиологического надзора осуществляется при опоре на комплексно-целевые программы, которые целенаправленно разрабатываются для каждой нозологической формы инфекционных болезней или групп инфекций (рис. 1).

В рамках этих программ определяются территории, группы населения, берущиеся под надзор. Также утверждаются длительность предсто-

ящего периода наблюдения, характер и объем собираемой информации, источники ее получения, способы и периодичность сбора первичной информации, частота (периодичность) анализа информации, методы анализа информации, первичные и окончательные формы учета и отчетности, а также способы их представления.

Эффективность эпидемиологического надзора определяется его способностью обеспечивать необходимой и достаточной для принятия рациональных управленческих решений информацией.

Качество такой информации напрямую зависит от соответствующих

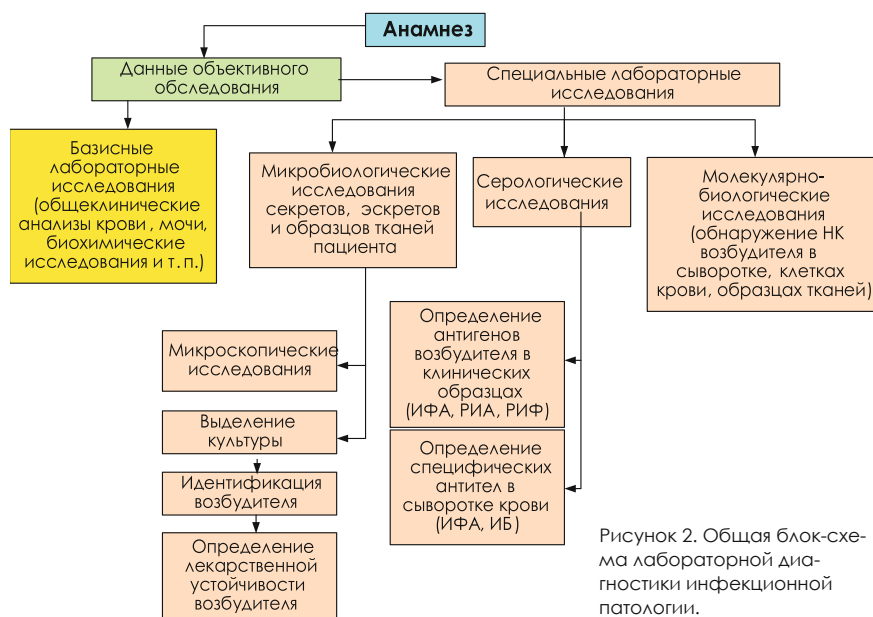


Рисунок 2. Общая блок-схема лабораторной диагностики инфекционной патологии.

программ по ее сбору. Для данных программ являются чрезвычайно важны следующие параметры [7]:

1. простота (объем, тип, методы сбора, анализа и передачи информации);
2. гибкость (возможности приспособления программы к меняющимся условиям);
3. приемлемость (соответствие действующим законам и правилам и понимание ее необходимости и полезности всеми задействованными лицами);
4. чувствительность, специфичность и достоверность (эффективность диагностики соответствующих заболеваний и оценки реальной эпидемиологической ситуации);
5. репрезентативность (возможность экстраполяции на другие периоды, территории и группы населения);
6. оперативности (время, необходимое для реализации);
7. стоимость.

Лабораторные исследования играют важную роль в любом процессе эпидемиологического надзора [8, 9]. Они необходимы при диагностике и прогнозировании состояния как единичного больного, так и всего населения в очаге эпидемии (вспышки) и, соответственно, в эффективности противоэпидемических мероприятий. На рисунке (рис. 2) представлена общая блок-схема лабораторной диагностики инфекционной патологии.

Первым этапом обследования каждого инфекционного очага является идентификация этиологического

агента, выделенного от больных. Это необходимо для подтверждения инфекционного характера патологии и ее окончательной диагностики.

Важно не только определить вид возбудителя, но и его особые характеристики, специфические именно для того очага. Лабораторные исследования позволяют установить генотип возбудителя, его серотип, устойчивость к медикаментозному лечению. Именно эти параметры будут в дальнейшем определять как динамику эпидемического процесса, так и эффективность противоэпидемических мероприятий, в частности, эффективность специфического этиотропного лечения, а также наличие и эффективность средств специфической профилактики.

Лабораторный анализ должен включать в себя как неспецифические, так и специфические исследования. К неспецифическим исследованиям можно отнести общеклинические анализы, целью которых является выявление динамики состояния пациента. Специфические, в свою очередь, представляют собой микробиологические и серологические исследования, целью которых является оценка эффективности этиотропной терапии. Также необходимо выявлять у пациента иммунологический статус и его динамику: наличие специфических антител, их класс, содержание (титр или концентрация), авидность антител класса G, динамику содержания антител разных классов и, при наличии протективных антител, напряженность специфического иммунитета.

Обследованию для оценки иммунологического статуса подлежат все лица, входящие в группы риска для соответствующей инфекции (а не только больных). Такая работа позволяет определить наличие и напряженность специфического иммунитета у указанных лиц и, следовательно, прогнозировать последующий характер эпидемического процесса.

Эпидемиологический надзор не должен ограничиваться обследованием населения исключительно в очаге инфекции: при потенциальной возможности распространения инфекции через объекты внешней среды лабораторному контролю подлежат и эти объекты для оценки их зараженности и, соответственно, риска инфицирования интактных лиц. И, наконец, при наличии вакцины лабораторному контролю подлежит ее качество, а также условия ее транспортирования, хранения и использования.

Оценка иммунологического статуса групп риска имеет чрезвычайно важное значение. Действующая система эпиднадзора основана на учете инфекционной заболеваемости, но показатели заболеваемости дают искаженное представление о фактическом распространении соответствующих инфекций и, соответственно, о фактической динамике эпидемиологического процесса. Дело в том, что нередко динамика показателей заболеваемости отражает не динамику фактической доли заболевших, а эффективность используемых методов лабораторной диагностики. Также следует учитывать, что многие инфекции могут течь бессимптомно, и в эпидемиологическом плане они могут быть не менее опасны, чем клинически выраженные формы. Такая угроза становится чрезвычайно серьезной в свете того, что подобные случаи, как правило, не регистрируются и не учитываются.

Объективную информацию об эпидемиологическом процессе может дать только регистрация всех без исключения случаев инфицирования в очаге, а это возможно только при лабораторном обследовании соответствующих групп риска, и наиболее вероятным методом такого обследования, по нашему мнению, является именно оценка иммунологического статуса лиц, входящих в эти группы [10].

Говоря о значимости лабораторных исследований в организации эф-

фективного эпиднадзора, необходимо отметить ряд проблем, с которыми сегодня сталкиваются работники клинических лабораторий.

Во-первых, это выбор диагностических тестов. Эффективность лабораторного исследования определяется его методом и способом реализации этого метода — конкретным тестом, используемым лабораторией, в частности, особенностями используемого конкретного набора реагентов. Перечень методов исследования, пригодных для практического использования, относительно невелик, и необходимый метод несложно выбрать, опираясь на известные характеристики этого метода. Однако на рынке продукции медицинского назначения нередко можно встретить большое число однотипных по принципу действия и назначению наборов реагентов, а также одинаковых по заявленной производителем диагностической эффективности, что ставит перед исполнителями проблему выбора при фактическом отсутствии критериев этого выбора.

Во-вторых, ни один метод исследования и, соответственно, ни один конкретный лабораторный тест в принципе не гарантирован от возможности получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Вероятность их получения при использовании разных методов различна, но никогда не равна нулю, и снизить ее до практически приемлемых величин можно, только используя сочетания нескольких методов исследования, однако практические руководства по использованию таких сочетаний при исследовании конкретных случаев отсутствуют [11].

В-третьих, серьезной проблемой лабораторной диагностики инфекций является различная диагностическая эффективность одних и тех же диагностических тестов при их использовании в различных регионах. В наибольшей степени это касается серологических методов исследования. Причина этого в том, что при разработке наборов реагентов для серологических исследований каждый производитель опирается прежде всего на характеристики возбудителей и на серологический статус здоровых интактных лиц, типичные для своего региона, а при контроле качества наборов чаще всего используются меж-

дународные стандарты содержания антигенов соответствующих возбудителей или антител к ним. При этом, естественно, не учитываются возможные межрегиональные различия как возбудителей, так и серологического статуса интактных лиц, которые могут сказываться на диагностической эффективности теста при его использовании в других регионах.

Что можно предложить для решения указанных проблем?

Прежде всего должен продолжаться поиск новых, все более чувствительных и специфичных методов диагностики. Одновременно с этим необходимо разрабатывать и внедрять в практику алгоритмы синхронного применения разных методов для диагностики всех социально значимых инфекций. Эти алгоритмы должны охватывать все возможные формы каждой из указанных инфекций.

Должна быть решена проблема выбора конкретных диагностических тестов применительно к особенностям региона, в котором проводятся исследования.

Можно предположить, что целесообразно каким-то образом ограничить многообразие однотипных по существу тестов, разработав и введя в действие соответствующие отраслевые нормативные документы, регламентирующие требования к конкретным диагностическим тестам. Данные стандарты должны стать обязательными для всех производителей таких тестов и заменить собой растущие множества технических условий отдельных производителей.

При условии, что в таких отраслевых документах в качестве обязательных показателей будут прописаны только те характеристики тестов, которые действительно определяют их диагностическую эффективность (в том числе и применительно к особенностям каждого региона), проблема выбора тестов диагностической лабораторией будет просто снята. Еще одной положительной стороной такого подхода будет являться то, что исчезнет нужда в согласованиях и экспертизах технических условий производителей, то есть будет одновременно упрощена процедура государственной регистрации их продукции.

Конечно, следует учитывать, что предлагаемые варианты решения проблем обеспечения максимальной эффективности лабораторной диагностики предполагают предварительное проведение широкомасштабных исследований с привлечением специалистов различного профиля. В первую очередь это должны быть исследования, направленные на выявление особенностей возбудителей социально значимых инфекций и иммунологического статуса соответствующих групп риска. Тем не менее их конечный результат — повышение эффективности эпиднадзора за социально значимыми инфекциями, по нашему мнению, стоит соответствующих затрат.

Список литературы

1. Ласт Д. М., Полунина А. В. Эпидемиологический словарь. — 2009.
2. Черкасский Б. А. Руководство по общей эпидемиологии. — М.: Медицина, 2001.
3. Иванова Л. А. и др. Комплексные лабораторные исследования при профессиональных заболеваниях органов дыхания // Пульмонология. — 2008. — № 4. — С. 26–30.
4. Сафонкина С. Г. Система обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия школьников // Профилактическая и клиническая медицина. — 2014. — № 3. — С. 67–71.
5. Сафонкина С. Г. и др. Организационные основы санитарно-эпидемиологического аудита и производственного контроля // Бюллетень Национального научно-исследовательского института общественного здоровья имени Н. А. Семашко. — 2015. — № 2. — С. 201–205.
6. Храпунова И. А., Кобзева Ю. В. Опасность формального подхода к проведению производственного контроля в ООМД на примере эпидемиологического расследования случая летальности от послеоперационного осложнения, вызванного эпидемическим штаммом *Klebsiella pneumoniae* // Медицинский алфавит. — 2014. — Т. 1. — № 4. — С. 15–18.
7. Симонова Е. Г. Научно-методические и организационные основы системы управления эпидемическим процессом // Москва. — 2010.
8. Онищенко Г. Г. и др. Актуальные направления совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней // Проблемы особо опасных инфекций. — 2009. — № 1. — С. 5–10.
9. Шарова И. Н. и др. Принципы организации и проведения лабораторной диагностики в мобильной лаборатории индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций // Проблемы особо опасных инфекций. — 2012. — № 3. — С. 94–96.
10. Михеева И. В. Совершенствование научно-методического обеспечения иммунопрофилактики-стратегическое направление исследовательской деятельности Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. — 2014. — № 2. — С. 35–39.
11. Хубутия М. Ш., Солонин С. А., Годков М. А. Проблемы обеспечения инфекционной безопасности органного и тканевого донорства при лабораторной диагностике гемоконтактных вирусных инфекций // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2016. — № 1. — С. 83–90.



Итоги XXI Форума «Национальные дни лабораторной медицины России»

XXI Форум «Национальные дни лабораторной медицины России», посвященный памяти профессора В. В. Меньшикова, состоялся 20–22 сентября 2017 года традиционно на базе спортивного комплекса «Олимпийский» (г. Москва).

Участники форума благодарят за поддержку Министерство здравоохранения Российской Федерации и Российскую академию наук.

Организаторами форума явились: Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова; Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства; Альянс клинических химиотерапевтов и микробиологов; Научно-практическое общество специалистов лабораторной медицины; Ассоциация производителей средств клинической лабораторной диагностики; Национальная ассоциация лабораторной, персонализированной и трансляционной медицины; Научное общество нефрологов России; Национальная ассоциация специалистов по тромбозам, клинической гемостазиологии и гемореологии; Российское научное общество иммунологов; Национальное научное общество инфекционистов.

Программа конференции формировалась, во многом ориентируясь на тематические пожелания практических специалистов. Программа включала обсуждение традиционных вопросов деятельности диагностических лабораторий в тесной взаимосвязи с актуальными потребностями кли-

нической практики. На заседаниях были сделаны акценты на практическом применении принципов доказательной и персонализированной медицины, внедрении инновационных медицинских технологий с учетом углубленного понимания междисциплинарных отношений, развитии информационных технологий, молекулярной и клеточной медицины. Особый интерес участников форума вызвали заседания, посвященные интерпретации результатов лабораторных исследований, проблемам их централизации, образовательным и кадровым вопросам, а также возможностям молекулярно-генетических исследований в диагностике различных форм патологии.

Доклады и дискуссии в рамках Национального конгресса бактериологов и Дня гемостаза значимо расширили целевую аудиторию участников форума за счет врачей клинических специальностей, специалистов микробиологических и бактериологических лабораторий.

На заключительном заседании принято решение о проведении XXII Форума «Национальные дни лабораторной медицины России» в сентябре 2018 года в Москве, предусматривающее разделение научной программы на отдельные дни и направления в целях подачи заявок на оценку ее структурных элементов как отдельных образовательных мероприятий в системе непрерывного медицинского и фармацевтического образования (НМО).

Полные версии итоговых материалов, тезисы и разрешенные к публикации презентации докладов можно найти на сайтах форума ndlm.ru и ндлм.рф.



Фонд инфраструктурных и образовательных программ запустил программу по наномолекулярным методам диагностики меланомы

В Ульяновском государственном педагогическом университете имени И. Н. Ульянова (УлГПУ) при поддержке Фонда инфраструктурных и образовательных программ запущен проект по обучению наномолекулярным методам диагностики меланомы. Программа повышения квалификации в этой области для врачей и лаборантов разработана в Научно-исследовательском центре фундаментальных и прикладных проблем биозологии и биотехнологии УлГПУ под руководством доктора биологических наук, профессора Елены Антоновой.

Меланома — одна из наиболее опасных и агрессивных злокачественных опухолей, она развивается практически бессимптомно, а прогрессирует стремительно, с высокой предрасположенностью к метастазированию. По данным ВОЗ, в мире диагностируются 132 тысячи новых случаев меланомы в год. По некоторым данным, каждый час от меланомы погибают шесть человек. В России, по данным за 2014 год, один человек из 2 тысяч имеет диагноз «меланома», около 12 процентов случаев меланомы заканчиваются смертью.

Перспективы лечения рака зависят в первую очередь от того, на какой стадии удалось поставить диагноз. Чем раньше будет обнаружена болезнь, тем больше шансов на успешный исход лечения. Поскольку рак это генетическая болезнь вследствие возникновения нарушений в структуре генов и не только, то лучший способ диагностики — ранняя и сверххранящая диагностика на молекулярно-генетическом уровне. В свою очередь, такой подход к диагностике требует внедрения высоких технологий в практическую медицину.

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биозологии и биотехнологии УлГПУ разработал программу для обучения использованию технологий ДНК-зондов и системы xMAP для диагностики онкологических заболеваний на примере меланомы.

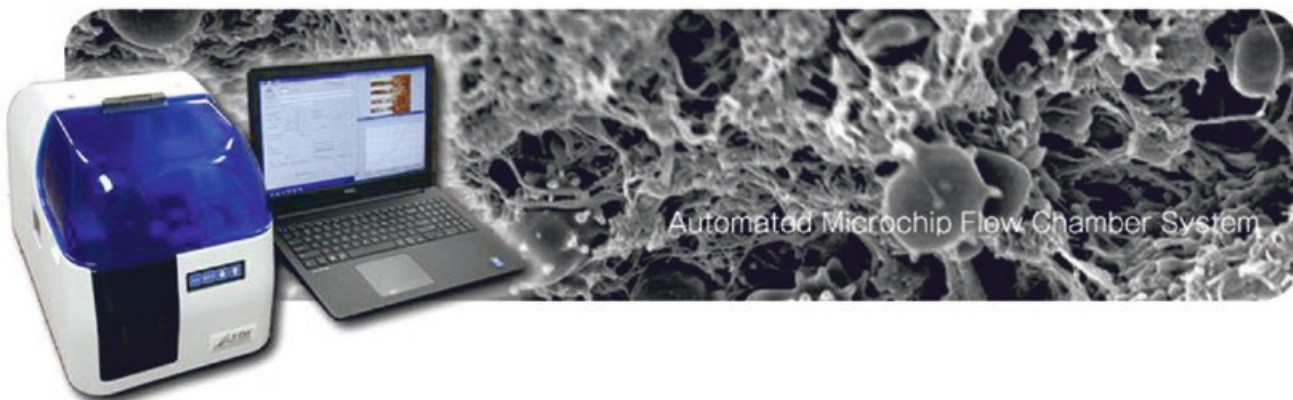
ДНК-зонды это химические структуры длиной до 10 нанометров, способные связываться с маркерами — специфическими фрагментами нуклеиновых кислот, присутствующими в раковых клетках. При этом высвобождаются флуорофоры, фрагменты молекулы, способные флуоресцировать. По их свечению и обнаруживают присутствие раковых клеток. Другая технология, xMAP, основана на использовании флуоресцирующих микросфер, несущих на поверхности наноразмерные ДНК-зонды, специфичные к исследуемым маркерам (мультиплексность — до 500 маркеров в образце).

Использование ДНК-зондов и технологии xMAP дает возможность поднять диагностику в области онкологии на более высокий уровень достоверности и чувствительности. При этом сама процедура не требует значимых затрат времени и доступна для населения.

Пилотная группа начнет двухмесячный курс обучения в рамках этой образовательной программы в УлГПУ с 25 сентября. После завершения учебы ее слушатели приобретут теоретические и практические знания, умения и навыки в области молекулярно-генетической диагностики с использованием методов нанодетекции маркеров в онкологии.



АНАЛИЗАТОР ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ **T-TAS[®] plus**



**РЕВОЛЮЦИОННЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ
ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ КРОВотоКА**
Использование T-Tas plus позволяет количественно оценить
формирование "белого" тромбоцитарного и "красного" тромбов
в картриджах, имитирующих тромбоз при атеросклеротических
повреждениях стенки сосуда.

ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ВОЗМОЖНО:

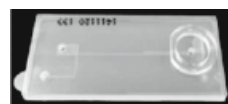
- оценить скорость тромбообразования.
- измерение требует 350-500 мл цельной стабилизированной крови
- время от 10 до 30 минут.

ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИМЕНЯЕТСЯ 2 ТИПА КАРТРИДЖА



PL картридж (покрытый коллагеном)

Применение: наблюдение и анализ тромбоцитарного тромбообразования



AR картридж (покрытый коллагеном и тканевым тромбопластином)

Применение: наблюдение и анализ смешанного тромбообразования

Область применения:

- Оценка действия новых антикоагулянтов
- Оценка действия антиагрегантов
- Диагностика патологии системы гемостаза
- Контроль качества препаратов крови

Product manufacturer:



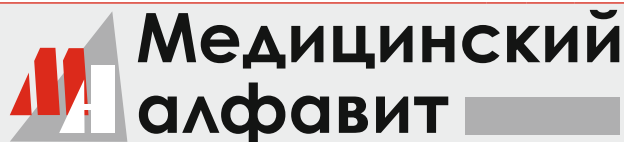
Head office:

1-23-7 Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo,
JAPAN

Дистрибьютор в РФ:

ООО «ТПО "Медио Лаб"»
109028, г. Москва, Тессинский пер., д. 5, стр. 1.
Тел./факс: +7 (495) 638-51-96/97
www.mediolab.ru | E: mediolab@mail.ru

БЛАНК-ЗАКАЗ на подписку на журнал 2018 год



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

Адрес (с почтовым индексом) _____

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

- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Стоматология» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Современная лаборатория» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Эпидемиология и гигиена» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Больница — все для ЛПУ» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Неотложная медицина» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Диагностика и онкотерапия» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Современная поликлиника» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Кардиология» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Практическая гастроэнтерология» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Неврология и психиатрия» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Современная гинекология» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Современная функциональная диагностика» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Артериальная гипертензия» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)

Наш индекс в каталоге
«РОСПЕЧАТЬ» 36228

Извещение	ООО «Альфмед»
	(наименование получателя платежа) 7716213348
	(ИНН получателя платежа) Рс № 40702810738090108773
	(номер счета получателя платежа) ПАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. МОСКВА
Кассир	(наименование банка и банковские реквизиты) К/с 30101810400000000225 БИК 044525225
	Годовая подписка на журнал «Медицинский алфавит. _____» на 2018 год
	(наименование платежа) Дата _____ Сумма платежа _____
	Платательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____
Квитанция	ООО «Альфмед»
	(наименование получателя платежа) 7716213348
	(ИНН получателя платежа) Рс № 40702810738090108773
	(номер счета получателя платежа) ПАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. МОСКВА
Кассир	(наименование банка и банковские реквизиты) К/с 30101810400000000225 БИК 044525225
	Годовая подписка на журнал «Медицинский алфавит. _____» на 2018 год
	(наименование платежа) Дата _____ Сумма платежа _____
	Платательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____

Как подписаться

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



ISO 9001:2015, 13485:2003

142530, РФ, Московская обл.,
г. Электрогорск, ул. Буденного, д.1
тел: 8-800-333-17-45
(звонок из регионов России бесплатный)
+7 (495) 287-44-48, 287-44-49
+7 (49643) 3-23-11, 3-30-85, 3-30-93
e-mail: ekolab-sbyt@mail.ru
<http://www.ekolab.ru>

***Верная диагностика-
качественное лечение!***

**«Сыворотки диагностические
сальмонеллезные адсорбированные О-поливалентные
для реакции агглютинации»
(жидкие, готовые к применению)**

РУ

№ РЗН 2017/5914

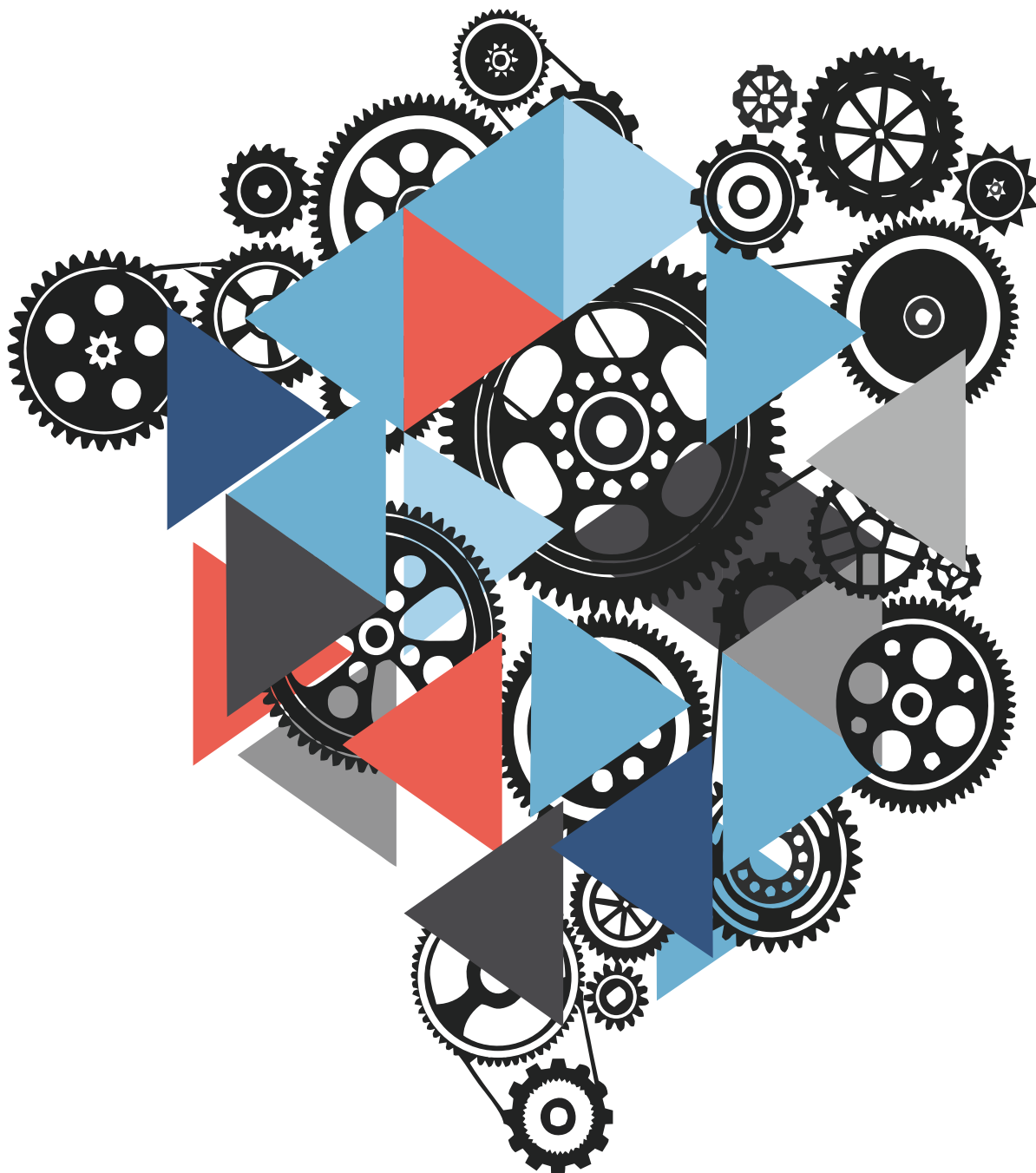
от 06.07.2017

Преимущества:

- Готовы к применению, не требуют предварительного приготовления
- Сыворотки упакованы во флаконы капельницы
- Флаконы упакованы в индивидуальную пачку с инструкцией по применению
- Возможна комплектация по одному флакону
- Жидкий реагент стабилен до истечения срока годности

НЕОБХОДИМАЯ ЧАСТЬ
СОВРЕМЕННОЙ ЛАБОРАТОРИИ

INNOVASYSTEM



121170, Москва, Кутузовский пр-т, д. 36, стр. 3, офис 102
info@innovasystem.pro
+7 (495) 984-96-74
innovasystem.pro