

Серии научно-практических рецензируемых журналов



Медицинский алфавит

22 (397) 2019



Modern
LABORATORY

MEDICAL ALPHABET
Russian Professional Medical Journal

Современная ЛАБОРАТОРИЯ

ТОМ № 3

- 14.03.10 КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ
ДИАГНОСТИКА
- 14.01.01 Акушерство и гинекология
- 14.01.02 Эндокринология
- 14.01.05 Кардиология
- 14.01.08 Педиатрия
- 14.01.09 Инфекционные болезни
- 14.01.10 Кожные и венерические
болезни
- 14.01.21 Гематология
и переливание крови
- 14.01.25 Пульмонология
- 14.01.28 Гастроэнтерология
- 14.01.29 Нефрология
- 14.02.02 Эпидемиология

Наш индекс в каталоге «РОСПЕЧАТЬ» 36228

www.medalfavit.ru

SARSTEDT – новая производственная площадка в России



Церемония закладки первого камня ООО «САРШТЕДТ» Россия, 22 июля 2019 года, Санкт-Петербург, Марьино

На следующий год после подписания Меморандума о совместной деятельности, заключенного между Санкт-Петербургом, банком ВТБ и компанией Sarstedt, 22 июля в индустриальном парке «Марьино» состоялась церемония закладки первого камня в строительство завода медицинской техники SARSTEDT.

Объем инвестиций в проект со стороны SARSTEDT составит около 1,5 млрд рублей / 21,1 млн евро. Завершение строительства этого производства запланировано на май 2020 года.

Эти достаточно высокие темпы строительства нового производственного комплекса площадью более 9 000 кв. м отражают ту динамику, с которой шло развитие бизнеса семейной компании SARSTEDT в России с 1991 года.

Новая производственная площадка всемирно известного поставщика лабораторного и медицинского оборудования будет обеспечивать потребности медицинских учреждений Санкт-Петербурга и других регионов России.

Кроме того, на заводе будет создано 40 высокопроизводительных рабочих мест.

На новом заводе, сертифицированном в соответствии с высочайшими стандартами качества и оснащенном современными производственными мощностями, будут работать две линии по производству систем взятия крови.



Денис Бортников, Юрген Сарштедт, Александр Беглов

S-Monovette® – Система взятия венозной крови

Изобретение S-Monovette® было революцией в технологии взятия венозной крови, существенно улучшившей качество и безопасность преаналитики.

S-Monovette® – первая система в мире, сочетающая два метода взятия крови – шприцевую и вакуумную техники в одном продукте.

Microvette® – Система взятия капиллярной крови

Идеальный продукт для взятия капиллярной крови при любом состоянии и у любых пациентов. В зависимости от требований доступны системы Microvette® с цилиндрической или конической внутренней пробиркой и объемом от 100 до 500 мкл. Капиллярную кровь можно собирать либо с помощью встроенного капилляра «end-to-end», либо самотеком с верхнего края пробирки.



SARSTEDT

info.ru@sarstedt.com • www.sarstedt.com



Современная лаборатория Том №3
Медицинский алфавит № 22 (397) 2019
www.medalfavit.ru

Издатель: издательство медицинской литературы ООО «Альфавит»
Тел.: (495) 616-48-00, 221-76-48
E-mail: medalfavit@mail.ru

Учредитель и главный редактор издательства
Т. В. Синица

Почтовый адрес: 129515, г. Москва, а/я 94
Адрес редакции: 129515, Москва, ул. Академика
Королева, д. 13, стр. 1, офис 804 А

Главный редактор серии журналов
«Медицинский алфавит» А. С. Ермолов

Объединенный редакционный совет журнала «Медицинский алфавит»

Акимкин Василий Геннадьевич, д.м.н., проф.
Амхадова Малкан Абдурашидовна, д.м.н., проф.
Балан Вера Ефимовна, д.м.н., проф.
Барбараш Ольга Леонидовна, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН
Брико Николай Иванович, д.м.н., проф.
Бутров Андрей Валерьевич, д.м.н., проф.
Вавилова Татьяна Владимировна, д.м.н., проф.
Голубев Валерий Леонидович, д.м.н., проф.
Громова Ольга Алексеевна, д.м.н., проф.
Данилов Алексей Борисович, д.м.н., проф.
Евдокимов Евгений Александрович, д.м.н., проф.
Ермолов Александр Сергеевич, д.м.н., проф.
Журавлева Марина Владимировна, д.м.н., проф.
Захаров Владимир Владимирович, д.м.н., проф.
Козлов Игорь Александрович, д.м.н., проф.
Королева Ирина Станиславовна, д.м.н., проф.
Крихели Нателла Ильинична, д.м.н., проф.
Круглова Лариса Сергеевна, д.м.н., проф.
Кузнецова Ирина Всеволодовна, д.м.н., проф.
Кулаков Анатолий Алексеевич, д.м.н., проф.
Малева Виктор Васильевич, д.м.н., проф.
Мартынюк Тамара Витальевна, д.м.н., проф.
Михин Вадим Петрович, д.м.н., проф.
Оганов Рафаэль Гегамович, д.м.н., проф.
Орлова Наталья Васильевна, д.м.н., проф.
Остроумова Ольга Дмитриевна, д.м.н., проф.
Плавнов Николай Филиппович, д.м.н., проф.
Проценко Денис Николаевич, д.м.н., проф.
Покровский Валентин Иванович, д.м.н., проф.
Покровский Вадим Валентинович, д.м.н., проф.
Путилина Марина Викторовна, д.м.н., проф.
Скоромец Александр Анисимович, д.м.н., проф.
Струков Петр Владимирович, д.м.н., проф.
Стрюк Раиса Ивановна, д.м.н., проф.
Тапильская Наталья Игоревна, д.м.н., проф.
Улитовский Сергей Борисович, д.м.н., проф.
Ушаков Рафаэль Васильевич, д.м.н., проф.
Шилова Маргарита Викторовна, д.м.н., проф.
Щербо Сергей Николаевич, д.м.н., проф.
Эмануэль Владимир Леонидович, 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 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.

Формат А4. Цена договорная.

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

Подписан в печать 30 августа 2019 года.

Содержание

- 6 Генетическая предрасположенность и устойчивость к некоторым
инфекционным заболеваниям. I. СПИД
С. Н. Щербо, Д. С. Щербо, А. Л. Тищенко, М. И. Савина, Т. И. Туркина
- 11 Разработка метода обнаружения однонуклеотидной замены в некодирующем
локусе ДНК rs17185536: потенциальное диагностическое значение
А. С. Горбенко, М. А. Столяр, Ю. Ю. Комаровский, М. А. Михалев,
В. В. Потылицына, Е. В. Васильев, И. А. Ольховский
- 15 Особенности гемопоэза у новорожденных с признаками
морфофункциональной незрелости
И. Б. Барановская, О. Ф. Самохина, Н. В. Бойко, И. П. Сысоева
- 22 Современные подходы к лабораторной диагностике микросфероцитарных анемий
Т. Т. Асатрян, М. Н. Зенина, Л. Б. Гайковская
- 26 Оценка эффективности Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов
периферической крови у больных сахарным диабетом первого типа
А. В. Луговая, Н. М. Калинина, В. Ф. Митрейкин, Ю. В. Эмануэль, Ю. П. Ковальчук,
А. В. Артемова, В. С. Эмануэль, Ю. В. Мусихина, В. Л. Эмануэль
- 33 Информативность цитокинового профиля в прогнозировании осложнений у больных
инфарктом миокарда на фоне хронической обструктивной болезни легких
А. В. Наумов, Л. В. Сароянц, Т. В. Прокофьева, О. С. Полунина, Е. А. Полунина
- 37 Взаимосвязь профилей антинуклеарных антител и цитокинов при системной
красной волчанке
Е. Н. Александрова, А. А. Новиков, Ж. Г. Верижникова, Т. А. Панафидина, Г. В. Лукина
- 43 Особенности методов оценки скорости клубочковой фильтрации
И. А. Волкова, М. И. Савина
- 48 Сепсис и острое повреждение почек — дорога с двухсторонним движением:
значения биомаркеров. Часть II
В. В. Вельков
- 56 Сравнение современных количественных методов определения уровня
D-димера, основанных на иммунотурбидиметрии
А. Н. Мамаев, М. В. Пыхтеева, С. С. Терехов, А. В. Кудинов, Д. А. Трухина,
Е. В. Григорьева, Н. Н. Ясафова
- 58 Экономическая эффективность внедрения ¹³C-уреазного дыхательного теста
на *Helicobacter pylori* в России
Р. Г. Плавник
- 62 Функциональная способность нейтрофилов у больных ишемической болезнью сердца
В. Ю. Мишланов, В. Е. Владимирский, А. В. Туев
- 68 К вопросу о важности правильной интерпретации общего анализа крови
Н. А. Соколова, М. И. Савина, О. С. Шохина
- 71 Ретроспективное определение референсных интервалов тиреотропного
гормона для российской популяции
А. Ю. Ольховик, Д. А. Павлов, А. В. Васильев, П. С. Садовников, В. Л. Эмануэль
- 78 Роль молекулярно-генетической неинвазивной лабораторной диагностики
в профилактике резус-конфликтной беременности
С. В. Хабаров, О. В. Денисова, В. М. Девиченский
- 86 Подписка

Contents

- 6 Genetic predisposition and resistance to certain infectious diseases. I. AIDS
S. N. Shcherbo, D. S. Shcherbo, A. L. Tishchenko, M. I. Savina, T. I. Turkina
- 11 Design of method for detecting single nucleotide polymorphisms of DNA non-coding region
rs17185536: potential diagnostic value
A. S. Gorbenco, M. A. Stolyar, Yu. Yu. Komarovskiy, M. A. Mikhalev, V. V. Potylitsyna, E. V. Vasilyev,
I. A. Olkhovskiy
- 15 Features of hematopoiesis in newborns with signs of morphofunctional immaturity
I. B. Baranovskaya, O. F. Samokhina, N. V. Boyko, I. P. Syssoeva
- 22 Modern approaches to laboratory diagnostic of microspherocytic anemia
T. T. Asatryan, M. N. Zenina, L. B. Gaikovaya
- 26 Evaluation of efficiency of Fas-mediated apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with
type 1 diabetes mellitus
A. V. Lugovaya, N. M. Kalinina, V. F. Mitreikin, Yu. V. Emanuel, Yu. P. Kovalchuk, A. V. Artyomova,
V. L. Emanuel, Yu. V. Musikhina, V. L. Emanuel
- 33 Informativeness of cytokine profile in predicting complications in patients with myocardial
infarction on background of chronic obstructive pulmonary disease
A. V. Naumov, L. V. Saroyants, T. V. Prokofyeva, O. S. Polunina, E. A. Polunina
- 37 Relationship of profiles of antinuclear antibodies and cytokines in systemic lupus erythematosus
E. N. Aleksandrova, A. A. Novikov, Zh. G. Verizhnikova, T. A. Panafidina, G. V. Lukina
- 43 Features of methods of glomerular filtration rate estimation
I. A. Volkova, M. I. Savina
- 48 Sepsis and acute kidney injury as two-way street: values of biomarkers
V. V. Velkov
- 56 Comparison of modern quantitative methods for determining level of D-dimer based on
immunoturbidimetry
A. N. Mamaev, M. V. Pykhteeva, S. S. Terekhov, A. V. Kudinov, D. A. Trukhina, E. V. Grigoryeva,
N. N. Yasafova
- 58 Economic efficiency of implementation of ¹³C-urea breath test on *Helicobacter pylori* in Russia
R. G. Plavnik
- 62 Functional ability of neutrophils in patients with ischemic heart disease
V. Yu. Mishlanov, V. E. Vladimirovskiy, A. V. Tuv
- 68 On importance of correct interpretation of complete blood count
N. A. Sokolova, M. I. Savina, O. S. Shokhina
- 71 Retrospective determination of reference intervals of thyroid-stimulating hormone for Russian population
A. Yu. Olkhovik, D. A. Pavlov, A. V. Vasilyev, P. S. Sadovnikov, V. L. Emanuel
- 78 Role of molecular genetic non-invasive laboratory diagnostics in prevention of RH-conflict pregnancy
S. V. Khabarov, O. V. Denisova, V. M. Devichenskiy
- 86 Subscription

Редакционная коллегия



Главный редактор серии «Современная лаборатория»

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 имени Н.И. Пирогова», г. Москва

Вавилова Татьяна Владимировна, д.м.н., проф., зав. кафедрой лабораторной медицины и генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. 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

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)

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

Эмануэль Владимир Леонидович, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, директор научно-методического Центра молекулярной медицины Минздрава России, ФГБОУ ВО СПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Editorial Board

The Editor in Chief

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

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

Gilmanov A. Zh., 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

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

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

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 образом:

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

Например: Имельбаева Э. А., Гильманов А. Ж. Особенности эритроцитарных антигенов // Медицинский алфавит. Сер. «Современная лаборатория» — 2019. — Т. 2, № 12 (365). — С. 14–18.

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

ТЕХ-D-ДИМЕР-АВТО

набор реагентов для количественного
определения D-димера в плазме крови



ДИАГНОСТИКА ТРОМБОЗА:



**БЫСТРО
НАДЕЖНО
КАЧЕСТВЕННО**

ТЕХНОЛОГИЯ  **СТАНДАРТ**

656037, Россия, г. Барнаул, пр. Калинина,
116/95, а/я 1351,
тел./факс: (3852) 22-99-37, 22-99-38, 22-99-39, 27-13-00.
e-mail: mail@tehnologia-standart.ru,
<http://www.tehnologia-standart.ru>

Офис в Москве: 109548, г. Москва,
ул. Шоссейная, д. 1, корп. 1.
Тел./факс: (495) 730-18-09, 730-41-69, (499) 176-85-96.
e-mail: tech-standart@yandex.ru



С. Н. Щербо



Д. С. Щербо



М. И. Савина



Т. И. Туркина

Генетическая предрасположенность и устойчивость к некоторым инфекционным заболеваниям. I. СПИД

С. Н. Щербо, д.б.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ФДПО^{1,2}

Д. С. Щербо, к.б.н., доцент кафедры¹

А. Л. Тищенко, д.м.н., проф., зав. кафедрой кожных и венерических болезней и косметологии ФНМО Медицинского института²

М. И. Савина, д.б.н., проф., проф. кафедры¹

Т. И. Туркина, д.б.н., проф., проф. кафедры¹

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

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

Genetic predisposition and resistance to certain infectious diseases. I. AIDS

S. N. Shcherbo, D. S. Shcherbo, A. L. Tishchenko, M. I. Savina, T. I. Turkina

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

Резюме

В обзоре рассматриваются вопросы, связанные с генетической предрасположенностью и устойчивостью к инфекционным заболеваниям. Генетические факторы в значительной мере определяют восприимчивость организма к различным заболеваниям, в том числе к инфекционным. Показана генетическая предрасположенность к туберкулезу, сальмонеллезу, вирусным гепатитам, клещевому энцефалиту, болезни Лайма, ВИЧ и другим. Знание молекулярно-генетических биомаркеров необходимо для выделения групп риска, проведения предиктивных мероприятий, в частности вакцинации. Основное влияние уделяется генам главного комплекса гистосовместимости, показана роль митохондриальной ДНК в восприимчивости к ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: ВИЧ, СПИД, однонуклеотидные полиморфизмы, лабораторные биомаркеры, гены главного комплекса гистосовместимости, гаплогруппы митохондриальной ДНК.

Summary

The review addresses issues related to genetic predisposition and resistance to infectious diseases. Genetic factors largely determine the susceptibility of the body to various diseases, including infectious ones. A genetic predisposition to tuberculosis, salmonellosis, viral hepatitis, tick-borne encephalitis, Lyme disease, HIV and others is shown. Knowledge of molecular genetic biomarkers is necessary for identifying risk groups, conducting predictive measures, in particular vaccination. The main influence is given to the genes of the main histocompatibility complex; the role of mitochondrial DNA in susceptibility to HIV infection is shown.

Key words: HIV, AIDS, single nucleotide polymorphisms, laboratory biomarkers, genes of the main histocompatibility complex, haplogroups of mitochondrial DNA.

Почти четверть ежегодных смертельных случаев во всем мире происходят из-за инфекционных заболеваний (ИЗ) [1]. Большую роль в контроле и своевременной диагностике ИЗ сыграли и играют молекулярно-генетические методы и, в частности, разработанный в конце прошлого века метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который наряду с успехами в фармакологии позволил значительно снизить смертность от ИЗ. В настоящее время существует потребность в совершенствовании и разработке новых методов лабораторной диагностики,

более эффективных вакцин и лучших терапевтических стратегий, в частности в связи с распространенностью антибиотикорезистентных штаммов. Успех решения указанной проблемы связан с пониманием механизмов взаимодействия «инфекционный агент — организм человека» на клеточном и молекулярном уровнях, выявлении предиктивных биомаркеров предрасположенности и тяжести протекания ИЗ в различных популяциях. К ИЗ необходимо подходить как мультифакториальным (МФЗ), зависящим от индивидуальных генетических особенностей как отдельных инди-

видуумов, так и популяций, с учетом различных эпигенетических воздействий. Воздействие инфекционных агентов следует рассматривать как внешнее, формирующее генетические особенности популяций. Огромное влияние на формирования предрасположенности и устойчивости к ИЗ сыграли многочисленные эпидемии. Так, эпидемия бубонной чумы, уничтожившая миллионы жителей Европы в XIV веке, в итоге положительно повлияла на здоровье и продолжительность жизни выживших поколений [2]. Такой вывод сделала антрополог, изучавшая костные

останки жителей Лондона, живших до, во время и после «черной смерти». Во время первой волны эпидемии (1347–1351 годы), инфекция унесла жизни примерно 30 % европейцев, в частности погибли около половины лондонцев, в первую очередь старики и люди всех возрастов со слабым здоровьем. Было установлено, что поколение, пережившее бубонную чуму, стало в среднем значительно здоровее, устойчивее к ИЗ, в том числе к повторным вспышкам чумы, и долговечнее: многие из выживших и их потомков доживали до 70–80 лет, чего практически не наблюдалось ранее, изменилась структура смертности. Бубонная чума оставила след в геноме переживших эпидемию поколений в пользу тех, кто нес определенные гены иммунной системы.

К категории мультифакториальных признаков, помимо прочих, относится и наследственная составляющая чувствительности к инфекциям. Генетические факторы в значительной мере определяют восприимчивость организма к различным заболеваниям, в том числе инфекционным. Генетическая предрасположенность к ИЗ может быть обусловлена целым рядом факторов [3]. Наличие в геноме человека совокупности генов, определяющих такую предрасположенность, обуславливает особенности защитного реагирования макроорганизма на инвазию патогенов. Известно, что тяжесть протекания ИЗ обусловлена сложным комплексом взаимодействия паразита и хозяина, при этом иммунный статус последнего играет столь же важную роль, что и тип возбудителя, вызвавшего заболевание. В настоящее время все большее внимание исследователей направлено на изучение генетических основ подверженности к инфекциям различной природы. Неуклонно растет число исследований генетических ассоциаций с инфекционными заболеваниями человека, включая полногеномные ассоциативные исследования GWAS. ИЗ отличаются от неинфекционных МФЗ тем, что имеют специфическую причину заболевания — инфекционный агент. Однако развитие и характер инфекционного процесса, чувствительность

организма к возбудителю определяются сложным характером взаимоотношений факторов окружающей среды, патогена, наследственных факторов. Генетика предрасположенности к ИЗ определяется формулой «одна инфекция — множество генов», а у лиц с первичными иммунодефицитами возникают различные заболевания как осложнение первичного иммунодефицита «один ген — многочисленные инфекции».

Генетическая подверженность инфекционным заболеваниям может быть реализована тремя способами: редкие мутации, приводящие к дефектам определенных звеньев противоинфекционного иммунитета; варианты генов с относительно сильным эффектом в популяциях и родословных, переживших эпидемию ИЗ; сочетание у индивида «нормальных» аллелей генов, в отдельности имеющих слабый эффект, но совокупность которых приводит к образованию особенности иммунитета, предполагающих к развитию ИЗ (наиболее вероятный вариант). Показана генетическая предрасположенность к туберкулезу, сальмонеллезу, вирусным гепатитам, клещевому энцефалиту, болезни Лайма, ВИЧ и др., которые будут рассмотрены нами в дальнейших публикациях. Знание таких биомаркеров необходимо для выделения групп риска, проведения предиктивных мероприятий, в частности вакцинации.

Как отмечалось выше, среди причин первой является относительно редко встречающиеся наследственные иммунодефициты, ассоциированные, как правило, с дефектами одного гена [4]. Однако более распространенной причиной является присутствие в геноме индивидуума полиморфизмов аллелей определенных генов, каждый из которых вносит небольшой вклад в фенотип, но сочетание влияния таких аллелей дает сильный эффект и ведет к ослаблению иммунной системы. Подобные ассоциации анализируются с помощью двух подходов: во-первых, отбор генов-кандидатов по данным клиники, биохимии, а также физиологии заболевания; во-вторых, с применением технологии полно-

геномного анализа скрининга ассоциаций GWAS. Первый подход не дает возможности идентифицировать новые гены в независимости от знаний их функции, и вместе с тем применительно к ИЗ — более низкая вероятность принятия ложной гипотезы, чем GWAS (при малых размерах выборки «случай — контроль» — до 250 человек) [5]. Выборка должна быть репрезентативна: для GWAS выборка больных и контроля должна быть не менее тысячи человек в каждой [6].

Технология GWAS основана на анализе большого числа полиморфизмов ДНК (секвенирование или биочипы), которые распределены по всему геному, и исследовании «распространенное заболевание — распространенный вариант», в них сравнивают аллели, частота которых превышает 5 % [7]. При поиске генетических вариантов, ответственных за тяжелые формы ИЗ, очень важен этап формирования выборок: контрольную группу целесообразно формировать из индивидуумов, у которых инфекция протекала в бессимптомной или легкой форме [8], придерживаться определенных фенотипов для предотвращения погрешностей и этнической и гендерной принадлежности (учитывать распространенность генетического фактора в данной этнической популяции).

Главный комплекс гистосовместимости (антигены лейкоцитов человека, HLA), фрагмент 4 м.п.н. на коротком плече хромосомы 6 (6p21.3) отвечает за иммунологические, аутоиммунные и инфекционные заболевания [9]. Рассмотрим применяемые для генетического анализа лабораторные технологии; так, иммуночип представляет собой платформу высокой плотности для точного и быстрого анализа ОНП в иммуногенетических исследованиях [10]. Увеличение пропускной способности, точности и длины прочитанных фрагментов характерно для технологий секвенирования следующего поколения (Next Generation Sequencing, NGS), которые вместе с развитием биоинформационных инструментов дают возможность проводить анализ главного комплекса гистосовмести-

Таблица 1
HLA-DRB 1-маркеры чувствительности и устойчивости к различным инфекционным заболеваниям [14]

Заболевание	Чувствительность	Самостоятельное очищение от патогена
Гепатит В	DRB 1*11(5), DR2, DR 11(5)	–
Лепра	DR2	–
Хламидиоз	DRB 1*15(2)	–
Папилломатоз	DRB 1*16(2), DRB 1*15(2)	–
Вирус Корсаки	DR2	DR3, DR4
Гистоплазмоз	DR 15(2)	–
Гепатит С	DRB 1*07, DRB 1*15(2)	DRB 1*01, *03, *04
ВИЧ-инфекция	DRB 1*04, DRB 1*13	DR5, DRB 1*01

мости с высоким разрешением [11]. Так, полногеномный сиквенс был применен для изучения HLA-A аллелей с высоким разрешением 1070 японцев [12]. Проблемой сиквенса является относительно небольшая величина прочитываемых фрагментов, однако ПЦР РВ больших фрагментов с системой PacBio и нанопорового секвенирования MinION позволяет эту задачу успешно решать [13]. Описан поставленный с помощью MinION рекорд по самому длинному прочтению молекулы ДНК клеточной линии человека GM12878. В итоге получили 91,2 гигабазы данных, что соответствует 30-кратному покрытию генома. Длина более половины прочтенных фрагментов ДНК составила 100 тысяч п. о. и более, и возможно определение последовательности ДНК до 882 тысяч п. о., что связано только с качеством выделения ДНК (полученная последовательность покрывает 85,8 %, а точность сборки приближается к 100 %). Известно, что локус главного комплекса гистосовместимости (HLA) имеет сложную структуру и множество повторов, поэтому его последовательность очень трудно определять. С технологией MinION все гены попали в одну непрерывную прочтенную последовательность, что избавило от необходимости собирать ее из фрагментов и, кроме того, распознаются эпигенетические метки (метилирование ДНК).

Благодаря чрезвычайно выраженному полиморфизму, который носит межэтнический характер, главный комплекс гистосовместимости обеспечивает выживание человека

в условиях воздействия инфекционных агентов, благодаря чему совершенствуется: специфичность HLA-DRB 1*01 ассоциирована с устойчивостью к ВИЧ-1. Генетический полиморфизм человека и устойчивость к ВИЧ / СПИД: помимо рецептора CD 4, особое место принадлежит корецепторам, используемым ВИЧ для проникновения в клетку — наличие замены А–G в позиции 801 в 3 — нетранслируемом регионе гена *SDF1* при гомозиготности по аллелю *SDF1*–3 А достоверно ассоциировано с отсрочкой развития клинической манифестации СПИД. Хемокин *SDF1*, связываясь с рецептором CXCR 4 9 (фузин), препятствует проникновению Т-тропных штаммов вируса, характерных для поздней стадии развития инфекции — препятствие быстрой прогрессии СПИД. Частота аллеля *SDF1*–3 А колеблется от 3 до 43 % в популяциях (в Океании 72 %) и почти не встречается в Черной Африке. Основным рецептором для М-тропных изолятов ВИЧ является CCR 5, присутствие или отсутствие которого не влияет на важные процессы жизнедеятельности в организме человека. Дефектный аллель CCR 5D 32 играет значительную роль в патогенезе ВИЧ: люди с генотипом D 32/D 32 практически резистентны к вирусам генотипа R 5 и обладают частичной устойчивостью к генотипу R 5X4. В Северной Европе (Финляндия, Мордовия) частота мутации — 16 %, на Сардинии — 4 %, и градиент расположен с севера на юг. Мутация в гене хемокинового рецептора CCR 2 приводит к замене валина на изолейцин (полиморфизм CCR 2–64I),

сопровождается продлением периода сероконверсии и развитием симптомов СПИД. Защитный эффект проявляется как у гетерозигот, так и гомозигот. Протективный эффект CCR 2–64I носит опосредованный характер, так как мутация расположена в трансмембранном домене и не может влиять на эффективность проникновения ВИЧ в клетку. Аллель CCR 2–64I является наиболее распространенным в Азии и Африке — 35 % и менее в Европе и Океании.

Были использованы данные о 30 тысячах ВИЧ-инфицированных европейского происхождения, из которых выделено около 500 больных с известной датой заражения и стабильными уровнями ВИЧ (вирусная нагрузка) в крови [15]. Проанализированы генетические особенности исследуемых и сопоставлены с уровнями вирусной нагрузки. В результате выяснилось, что наличие одного из вариантов гена *HLA-C* — rs9264942 — статистически связано со значительно меньшей скоростью размножения вируса в зараженном организме. Так, уровни вирусной нагрузки у обладающих двумя копиями варианта rs9264942 были в среднем на 90 % ниже, чем у остальных больных.

Уровень вирусной нагрузки при ВИЧ-инфекции напрямую связан с вероятностью развития СПИДа, поэтому прогноз для больных, у которых этот показатель невелик, значительно лучше, чем для тех, у кого он находится на стабильно высоком уровне.

По-видимому, мутация rs9264942 связана с повышенной выработкой HLA-C. Указанный белок играет важную роль в иммунной системе, в частности он участвует в распознавании клеток, зараженных вирусами. Ранее было установлено, что ВИЧ способен блокировать действие двух белков с аналогичными функциями под названиями HLA-A и HLA-B. Однако, судя по всему, он не способен противодействовать HLA-C. По данным генетиков, до 10 % европейцев являются счастливыми обладателями двух копий rs9264942, наличие которых связано с 90 %-ным снижением уровня вирусной нагрузки при ВИЧ-инфекции. Еще 50 % обладают одной копией этого гена, что

Таблица 2
Генетические полиморфизмы, связанные с устойчивостью и предрасположенностью к ВИЧ-инфекции

Тип исследования	Выборка	Гены	ОНП	Ссылка
ВИЧ-1	486 пациентов с сероконверсией, контроль — 140 европейцев	HCP5/B*5701 HLA-C	rs2395029 rs9264942	[16]
ВИЧ-1, контроль	2362 европейцев	HSPA1B-C 6orf48 LOC 105375015 LOC 105375015 HCP5 PSORS 1C 1	rs9368699 rs9264942 rs9264942 s2395029 rs3815087	[17]
Прогрессия СПИД	Европейцы: 275 и 86 — серопозитивные без прогресса и с прогрессом соответственно; 1352 — серонегативный контроль	HCP5 LOC 105375015	rs2395029 rs10484554	[18]
ВИЧ-1, контроль	974 — контроль; 2648 инфицированных с прогрессом (европейцы, африканцы, американцы)	HLA-C HLA-B*57:01 MICA PSORS 1C 3 HLA-B Intergenic HLA-B	rs9264942 rs2395029 rs4418214 rs3131018 rs2523608 rs2255221 rs2523590	[19]
ВИЧ-восприимчивость	6334 инфицированных; 7247 — контроль (европейцы)	MICA — LOC 105375017	rs4418214	[20]

связано со снижением этого показателя на 60 %. В то же время этот вариант гена значительно меньше распространен среди африканцев. Одна его копия встречается только у 40 % выходцев с Африканского континента. Открытие нового гена может привести к разработке новых способов лечения ВИЧ-инфекции. Например, в будущем ученые смогут найти способ искусственно повысить выработку белка HLA-C в организме ВИЧ-инфицированных пациентов.

Мутация, носителями которой являются более 90 % африканцев, защищает от малярии, но значительно увеличивает риск заражения ВИЧ. Данная мутация распространена исключительно среди выходцев из Африки и не встречается у представителей других этнических групп. Белок под названием DARC (Duffy-антиген рецептор для хемокинов) располагается на мембране эритроцитов. Малярийные паразиты *Plasmodium vivax* и *Plasmodium knowlesi* используют его для проникновения в красные кровяные клетки. У большинства жителей Африки белок DARC отсутствует из-за мутации соответствующего гена — это защищает их от двух типов возбудителей малярии, которые не могут размножаться в их организме. Большинство случаев малярии в Африке вызвано другим, более опасным возбудите-

лем малярии *Plasmodium falciparum*. Несмотря на то что Африка пострадала от эпидемии ВИЧ / СПИДа значительно больше других регионов, до последнего времени не удавалось выявить специфические генетические факторы, объясняющие подверженность африканцев этой инфекции. Предполагается, что ВИЧ использует белок DARC для проникновения в эритроциты. Чтобы проверить роль белка в развитии ВИЧ-инфекции, к исследованию были привлечены 3 400 чернокожих ветеранов и военнослужащих американских ВВС, поскольку среди чернокожих жителей Африки было сложно найти достаточное количество людей, у которых отсутствовала мутация DARC. Как выяснилось, наличие мутации DARC было связано с 40 %-ным увеличением риска ВИЧ-инфекции. Генетические факторы предрасположенности к ВИЧ-инфекции, как правило, связаны с ускоренным течением заболевания. Вероятно, с мутацией гена DARC могут быть связаны как минимум 11 % случаев ВИЧ-инфекции на Африканском континенте (около 2,5 млн больных). Остается неясным механизм, связывающий африканскую мутацию с повышенным риском заражения ВИЧ, — возможно, отсутствие белка DARC может приводить к снижению естественного противовирусного иммунитета.

У людей, инфицированных ВИЧ, обнаруживают антитела практически ко всем белкам вируса: и структурным, и регуляторным. До 90 % всех обнаруживаемых у ВИЧ-инфицированного человека антител направлены как раз на один из участков, называемый доменом V3, у которого есть консервативная последовательность, к которой и образуются антитела, обладающие широким нейтрализующим действием. В организме человека ВИЧ не только не нейтрализуется антителами, но еще и распространяется по клеткам иммунной системы — макрофагам. Основную роль в реализации этого феномена (*in vivo*) как раз и играют антитела к домену V3. Кроме того что ВИЧ сам подвержен мутациям, его еще «принуждает» меняться иммунная система человека. Низкие концентрации вируснейтрализующих антител усиливают инфекционность вируса благодаря феномену антителозависимого усиления инфекции. Но как только их уровень достигает определенного порога, под давлением этих же антител селекционируется вариант вируса, способный избежать их нейтрализующего действия. Цикл многократно повторяется на протяжении жизни ВИЧ-инфицированного и больного СПИДом. Цель процесса — накопление более опасного варианта ВИЧ — Х4. Он очень активно

осваивает клетки иммунной системы. Процесс накопления вариантов вируса Х4 достигает максимума к концу бессимптоматического периода болезни. Когда болезнь вступает в стадию СПИДа, то и разнообразие вариантов вируса идет на убыль.

Некоторые варианты митохондриальной ДНК (гаплогруппы) ассоциируются с ускорением развития СПИДа в два раза [21]. Изучили данные пяти долгосрочных исследований с участием 1833 ВИЧ-инфицированных пациентов. Все исследования были проведены в 80-х и начале 90-х годов прошлого века, до широкого внедрения антиретровирусной терапии, что позволило проследить естественный ход развития заболевания. Определяли продолжительность течения ВИЧ-инфекции у пациентов до развития СПИД-ассоциированных заболеваний. Выяснилось, что у людей, принадлежащих к митохондриальным гаплогруппам U5a1 и J, ВИЧ-инфекция прогрессировала в два раза быстрее, чем в среднем у участников. В то же время у тех, кто принадлежал к гаплогруппе H3, СПИД развивался более чем в два раза дольше, как показало исследование. Митохондриальные гаплогруппы различаются по количеству вырабатываемой ими энергии, причем гаплогруппы U5a1 и J вырабатывают меньшее ее количество. Провоцируемый ВИЧ апоптоз (клеточная гибель) активнее протекает в тех иммунных клетках, митохондрии которых вырабатывают меньше энергии. Этот факт может служить возможным объяснением ускоренного развития СПИДа у пациентов, принадлежащих к гаплогруппам U5a1 и J. В будущем определение митохондриальной ДНК может быть использовано при прогнозировании развития ВИЧ у пациента, а также для определения сроков начала антиретровирусной терапии.

Оказалось, что более высокий уровень выживаемости имеют носители определенного варианта ДНК митохондрий (мтДНК). Исследована структура мтДНК у 150 пациентов, госпитализированных в отделения интенсивной терапии. Ранее высказывались предположения о возможной взаимосвязи работы митохон-

дрий со способностью организма противостоять тяжелым инфекциям, в частности пневмонии и MRSA (стафилококкам, обладающим устойчивостью к антибиотикам). Удалось выделить 10 основных вариантов мтДНК [22], а выживаемость пациентов оценивалась через полгода после развития тяжелых инфекций. У больных, имеющих разновидность мтДНК под названием гаплогруппа H, показатели выживаемости оказались более чем в два раза выше по сравнению с другими девятью группами. Гаплогруппа H — это самый молодой и одновременно самый распространенный вариант мтДНК, который имеется у 40 % людей. Последнее открытие поможет разработать новые, более эффективные методы лечения, позволит использовать дифференцированный терапевтический подход к больным, имеющим разные варианты мтДНК, (имеющим меньшие шансы на выживание — более агрессивная тактика). Для этого предстоит разработать дешевые и удобные тесты определения мтДНК.

Список литературы

1. Morens D. M., Follers G. K., Fauci A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. // *Nature*. — 2004. — 430. — 6996. — P. 242–249.
2. DeWitte S. N. Mortality risk and survival in the aftermath of the medieval Black Death. // *PLoS One*. — 2014. — 9. — 5: e96513.
3. Kumar V., Wijmenga C., Xavier R. J. Genetics of immune-mediated disorders: from genome-wide association to molecular mechanism. // *Curr. Opin. Immunol.* — 2014. — 31. — P. 51–57.
4. Boisson-Dupuis S., Bustamante J., El-Baghdadi J. et al. Inherited and acquired immunodeficiencies underlying tuberculosis in childhood. // *Immunol. Rev.* — 2015. — 264. — P. 103–120.
5. Amos W., Driscoll E., Hoffman J. I. Candidate genes versus genome-wide associations: which are better for detecting genetic susceptibility to infectious disease? // *Proc. Biol. Sci.* — 2011. — 278. — P. 1031–1037.
6. Burton P. R., Hansell A. L., Fortier I. et al. Size matters: just how big is BIG? Quantifying realistic sample size requirements for human genome epidemiology. // *Int. J. Epidemiol.* — 2009. — 38. — P. 263–273.
7. Newport M. J., Finan C. Genome-wide association studies and susceptibility to infectious diseases. // *Brief Funct Genomics*. — 2011. — 10. — P. 98–107.
8. Loeb M., Eskandarian S., Ropp M. et al. Genetic variants and susceptibility to neurological complications following West Nile virus infection. // *J. Infect. Dis.* — 2011. — 204. — P. 1031–1037.

9. Matzaraki V., Kumar V., Wijmenga C. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. // *Genome Biol.* — 2017. — 18: 76.
10. Cortes A., Brown M. A. Promise and pitfalls of the Immunochip. // *Arthritis Res Ther.* 2011; 13: 101. DOI: 10.1186/ar3204.
11. Carapito R., Radosavljevic M., Bahram S. Next-generation sequencing of the HLA locus: methods and impacts on HLA typing, population genetics and disease association studies. // *Hum. Immunol.* — 2016. — 77. — 11. — P. 1016–1023.
12. Nagasaki M., Yasuda J., Katsuo F. et al. Rare variant discovery by deep whole-genome sequencing of 1,070 Japanese individuals. // *Nat Commun.* — 2015; 6: 8018. DOI: 10.1038/ncomms9018.
13. Jain M., Koren S., Miga K. H. et al. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. // *Nat. Biotechnol.* — 2018. — 36. — 4. — P. 338–345.
14. Хаитов Р. М., Алексеев А. П., Трофимов Д. Ю. Иммуногеномика и генодиагностика человека. Национальное руководство. ГЭОТАР-Медиа. — М. — 2017–256 с.
15. Fellay J., Shianna K. V., Ge D. et al. A Whole-Genome Association Study of Major Determinants for Host Control of HIV-1. // *Science*. — 2007. — 10.1126/science.1143767.
16. Fellay J., Shianna K. V., Ge D. et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. // *Science*. — 2007. — 317. P. 944–947.
17. Fellay J., Ge D., Shianna K. V., Colombo S. et al. Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. // *PLoS Genet.* — 2009. — 5. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000791.
18. Limou S., Le Clerc S., Coulonges C. et al. Genomewide association study of an AIDS-nonprogression cohort emphasizes the role played by HLA genes (ANRS Genomewide Association Study 02) // *J. Infect. Dis.* — 2009. — 199. — P. 419–26.
19. International HIV Controllers Study. Pereyra F., Jia X., McLaren P. J. et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. // *Science*. — 2011. — 330. — P. 1551–1557.
20. McLaren P. J., Coulonges C., Ripke S. et al. Association study of common genetic variants and HIV-1 acquisition in 6,300 infected cases and 7,200 controls. // *PLoS Pathog.* — 2013. — 9. — 7. doi: 10.1371/journal.ppat.1003515.
21. Hendrickson S. L., Hendrickson S. L., Ruiz-Pesini E. et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression // *AIDS*. — 2008. — 22. — 18. — P. 2429–2439.
22. Chinnery P. F., Elliott H. R., Syed A. Mitochondrial DNA haplogroups and risk of transient ischaemic attack and ischaemic stroke: a genetic association study. // *Lancet Neurol.* — 2010. — 9. — 5. — C. 498–503.

Для цитирования. Щербо С. Н., Щербо Д. С., Тищенко А. А., Савина М. И., Туркина Т. И. Генетическая предрасположенность и устойчивость к некоторым инфекционным заболеваниям. I. СПИД // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория» — 2019. — Т. 3–22(397). — С. 6–10.



Разработка метода обнаружения однонуклеотидной замены в некодирующем локусе ДНК rs17185536: потенциальное диагностическое значение

А. С. Горбенко, биолог¹

М. А. Столяр, биолог¹, лаборант²

Ю. Ю. Комаровский, биолог¹

М. А. Михалев, врач-гематолог¹, н.с.³

В. В. Потылицина, к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики⁴

Е. В. Васильев, врач-гематолог⁵

И. А. Ольховский, с.н.с.², директор¹

¹Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, г. Красноярск

²ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр“» Сибирского отделения РАН, г. Красноярск

³КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7», г. Красноярск

⁴КГБУЗ «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства», г. Красноярск

⁵КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск

Design of method for detecting single nucleotide polymorphisms of DNA non-coding region rs17185536: potential diagnostic value

A. S. Gorbenko, M. A. Stolyar, Yu. Yu. Komarovskiy, M. A. Mikhalev, V. V. Potylytsyna, E. V. Vasilyev, I. A. Olkhovskiy

Krasnoyarsk branch of the National Medical Research Center for Hematology, Federal Research Centre 'Krasnoyarsk Scientific Centre', Krasnoyarsk Interdistrict Clinical Hospital No. 7, Krasnoyarsk Regional Clinical Center for Maternal and Child Health, Regional Clinical Hospital; Krasnoyarsk, Russia

Резюме

Проведенное в 2018 году широкомасштабное исследование баз данных секвенирования ДНК (Jorgenson E., et al.) для поиска наследственной предрасположенности к ранней эректильной дисфункции выявило ассоциацию с однонуклеотидной заменой rs17185536-T, регулирующей экспрессию топографически близких генов, среди которых находится ген SIM1, играющий важную роль в поддержании массы тела и сексуальной функции. Близость локуса rs17185536 к генам CCNC (циклин C), PRDM13 (метилтрансфераза гистонов) и USP45 (убиквитин-специфическая пептидаза 45) предполагает возможное участие данного полиморфизма в патогенезе и других заболеваний, связанных с нарушениями функции продуктов данных генов. Цель работы заключалась в разработке методики определения локуса ДНК rs17185536 и проверке предположения о его связи с риском развития патологии беременности и плода, а также с прогнозом развития хронических миелопролиферативных заболеваний. Материалы и методы. В исследовании были включены 280 человек, 81 из которых здоровые доноры, 116 беременных женщин, 25 пациентов с истинной полицитемией, 29 с эссенциальной тромбоцитемией и 29 с первичным миелофиброзом. Результаты. С использованием оригинальной методики определения rs17185536 аллель-специфической ПЦР-РВ показано, что распространенность аллеля T среди всех обследованных групп составила 16%, и варианты генотипов составили: C/C — 73%, C/T — 23% и T/T — 4%, что соответствует данным Jorgenson et al. Отсутствие статистически значимых различий частоты встречаемости данного полиморфизма хронических миелопролиферативных заболеваний свидетельствует о низкой вероятности вовлечения rs17185536-T в патогенез данных заболеваний. В группе беременных женщин показана ассоциация аллеля rs17185536-T с ожирением, миомой матки и развитием преэклампсии. Выводы. Впервые с использованием оригинальной методики анализа проведена оценка распространенности гена наследственной предрасположенности к импотенции. Несмотря на топографическую близость локуса rs17185536 к генам регуляции репарации и функционирования ДНК, его полиморфизмы не оказывают влияния на риск развития хронических миелопролиферативных заболеваний. Обнаруженная ассоциация аллеля rs17185536-T с риском развития патологии беременности требует дополнительного изучения.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм ДНК, rs17185536, LOC 728012, хронические Ph-негативные миелопролиферативные новообразования, патология беременности.

Summary

A large-scale study of DNA sequencing databases (Jorgenson E., et al., 2018) to search for hereditary susceptibility to early erectile dysfunction revealed an association with the rs17185536-T polymorphism regulating the expression of topologically associating domain, among which is the SIM1 gene, which plays an important role in maintaining mass body and sexual function. The proximity of the rs17185536 locus to the CCNC (cyclin C), PRDM13 (histone methyltransferase) and USP45 (ubiquitin-specific peptidase 45) genes suggests the possible involvement of this polymorphism in the pathogenesis and other diseases associated with impairments of these genes. Materials and methods. The study included a total of 280 people: 81 of which were healthy donors, 116 pregnant women, 25 patients with polycythemia vera, 29 with essential thrombocythemia, and 29 with primary myelofibrosis. Results. Using the original method of determining the polymorphism rs17185536, the allele of specific PCR-RT showed that the prevalence of the T allele among all examined patients was 19%, and variants of the genotypes: C/C with 73%, C/T with 23% and T/T with 4%, which corresponds to Winkler et al. data. The absence of statistically significant differences in the frequency of occurrence of this polymorphism in the pathology of pregnancy and in chronic myeloproliferative diseases indicates a low probability of involvement of rs17185536-T in the pathogenesis of these diseases. In the group of pregnant women, there is an association of the rs17185536-T allele with obesity, uterine fibroids and the development of preeclampsia. Conclusions. For the first time, using the original method of analysis, it was confirmed that the Russian population has a comparable prevalence of the gene of hereditary susceptibility to impotence. Despite the topographic proximity of the rs17185536 locus to the genes regulating the repair and functioning of DNA, its polymorphisms do not affect the risk of chronic myeloproliferative diseases developing. The association of the rs17185536-T allele with the risk of developing a pregnancy pathology requires further study.

Key words: single nucleotide DNA polymorphism, rs17185536, LOC 728012, chronic Ph-negative myeloproliferative neoplasms, pregnancy pathology.

Введение

Результаты исследований последовательности ДНК в рамках широко проводимого изучения связи отдельных генетических и фенотипических особенностей Genome-Wide Association Studies (GWAS) позволяют выявлять перспективные точки приложения для новых персонализированных подходов к профилактике и терапии заболеваний. Среди таких выявляемых генетических детерминант часто встречаются участки нетранслируемой ДНК, не кодирующие никаких известных функциональных белков. Одним из таких генетических локусов является участок ДНК на шестой хромосоме 6q16 LOC 728012, имеющий два варианта однонуклеотидного полиморфизма rs17185536 (Т/С). Ранее была показана ассоциация данного полиморфизма с индексом «талия / бедра» [1], уровнем свободного тироксина в крови [2], нормализацией артериального давления в процессе немедикаментозной терапии гипертензии [3], а также вовлечение в регуляцию иммунного ответа [4].

Однако наибольшую известность полиморфизм rs17185536-Т получил после недавней публикации [5], продемонстрировавшей его связь с развитием ранней эректильной дисфункции. Авторы объясняют выявленный феномен вовлечением rs17185536 в регуляцию экспрессии расположенного рядом гена *SIM1*. Ген *SIM1* — сокращенное название от single-minded family basic helix-loop-helix transcription factor 1, является частью системы «лептин — меланокортин», которая имеет важную роль в поддержании массы тела и регуляции сексуальной функции. Вместе с тем, кроме гена *SIM1*, в топологически ассоциирующей области с rs17185536 находятся также гены *MCHR2* (рецептора меланин-концентрирующего гормона второго типа), *CCNC* (циклин С), *PRDM13* (метилтрансфераза гистонов) и *USP45* (убиквитин-специфическая пептидаза 45, которая важна для репарации двойных разрывов ДНК с участием XPF-ERCC 1). Учитывая ассоциацию экспрессии этих генов, а также микроделений и транслокаций 6q16 с патологией развития плода [6] и рядом онкологических заболеваний [7], можно было предположить, что исследование полиморфизма rs17185536 будет полезным в оценке риска бесплодия, патологии беременности, а также для прогноза развития онкогематологических заболеваний. До сих пор ассоциация rs17185536 с патологией беременности и отдельными вариантами хронических миелопролиферативных

заболеваний (ХМПЗ) не исследовалась. Вместе с тем в доступной литературе мы не нашли описания метода детекции данного полиморфизма, не связанного с необходимостью секвенирования ДНК.

Целью настоящей работы являлись разработка методики для выявления однонуклеотидной замены в rs17185536 и оценка распространенности его аллельных вариантов у беременных и пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями.

Материалы и методы

Клинические образцы. В исследование включены анонимные пробы крови 25 пациентов с истинной полицитемией (ИП) в возрасте от 29 до 73 лет (14 женщин и 11 мужчин), 29 пациентов с эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) в возрасте от 36 до 77 лет (20 женщин и 9 мужчин), 29 пациентов с развившимся на момент обследования миелофиброзом (МФ) в возрасте от 42 до 83 лет (15 женщин и 14 мужчин), а также анонимные пробы 81 здорового донора крови в возрасте от 20 до 68 лет (57 женщин и 24 мужчины), составляющих группу контроля. Кроме того, в исследование были включены 116 проб крови женщин от 19 до 37 лет с различными вариантами патологически протекающей беременности: с миомой матки — 28, с ожирением II-III ст. — 18 и с развившейся во время беременности преэклампсией — 13). Поскольку исследование имело исключительно эпидемиологический характер, сбор персонализированной информации не проводился.

Выделение ДНК. Выделяли ДНК из лейкоцитов крови с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», Россия).

Дизайн праймеров. Используя систему подбора праймеров WASP [8], был разработан набор с оригинальными праймерами для выявления данного полиморфизма с помощью реакции ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Праймеры для ПЦР-РВ были следующими: прямой праймер на аллель «дикого» типа 5'-ATGAACCTTCAATTACC ATACAATC-3'; прямой праймер на аллель «мутантного» типа 5'-ATGAACCTTCAATTACCATACAATT-3'; общий обратный праймер 5'-TTCAAATGTTGTTCAAAGCA-3'. Детекцию продукта реакции осуществляли с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I.

Таблица 1
Значения пороговых циклов, полученных в результате проведения ПЦР-РВ в градиенте температур

Температура отжига, °C	Проба № 1, генотип С/С		Проба № 2, генотип С/Т		Проба № 3, генотип Т/Т	
	Аллель С	Аллель Т	Аллель С	Аллель Т	Аллель С	Аллель Т
65,0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
64,5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
63,3	30,7	N/A	28,5	N/A	N/A	34,6
61,4	21,1	N/A	21,6	23,4	N/A	24,7
59,0	19,0	31,8	20,7	20,5	N/A	22,0
57,0	18,6	30,2	20,5	20,5	N/A	20,8
55,7	18,7	29,7	20,4	20,5	N/A	21,8
55,0	18,6	29,4	20,5	20,4	N/A	22,6

Примечание: N/A — отсутствие флуоресцентного сигнала.

Проведение ПЦР. Для проведения реакции амплификации использовался амплификатор Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Условия амплификации были следующие: 95 °С в течение 5 мин., 40 циклов при температуре 95 °С в течение 15 с и 57 °С в течение 60 с.

Статистическую обработку полученных данных распространности генетических полиморфизмов проводили с использованием web-калькулятора на сайте gen-exp.ru.

Результаты

Для оптимизации режима отжига праймеров провели постановку ПЦР-РВ проб с заранее известными генотипами при градиенте температур в диапазоне 55–65 °С. В ходе эксперимента установлено, что оптимальная температура отжига праймеров составляет 57 °С. Результаты представлены в табл. 1. Величина порогового цикла больше 30 свидетельствует об отсутствии в пробе искомого аллеля. В пробе с генотипом С/С при температуре 57 °С наблюдался наиболее ранний пороговый цикл для аллеля С, при этом для аллеля Т он был больше 30. В гетерозиготной пробе с генотипом С/Т наблюдались одинаковые значения пороговых циклов для аллелей С и Т при температуре 57 °С. В пробе с генотипом Т/Т наблюдались отсутствие сигнала от аллеля «дикого» типа и наиболее ранний пороговый цикл для «мутантного» аллеля, что является оптимальным при исследовании однонуклеотидных полиморфизмов.

На рисунке представлен пример детекции отдельных замен rs17185536 с использованием разработанного метода, результаты хорошо воспроизводятся в дублированных постановках.

В табл. 2 приведены результаты выявления однонуклеотидного полиморфизма rs17185536 среди обследованных групп пациентов. В целом по всем обследованным лицам частоты распределения соответствуют закону Харди-Вайнберга. Было выявлено, что в целом по всем обследованным группам частота встречаемости мутантного аллеля Т составила 16%. Значимых различий в распределении аллельных полиморфизмов в выбранных группах пациентов с ХМН обнаружено не было ($p > 0,05$).

Вместе с тем результаты тестирования в выделенной группе беременных женщин с повышенным риском развития патологии продемонстрировали существенное различие в распределении аллелей rs17185536 (табл. 3). Аллель С детектировалась в 2,6 раза чаще у беременных без патологии, а аллель Т в 1,7 чаще в группе риска в сравнении с контролем. При сравнении беременных без патологии и группы риска отношение шансов ассоциации аллеля Т составило более 4,3 ($P < 0,01$).

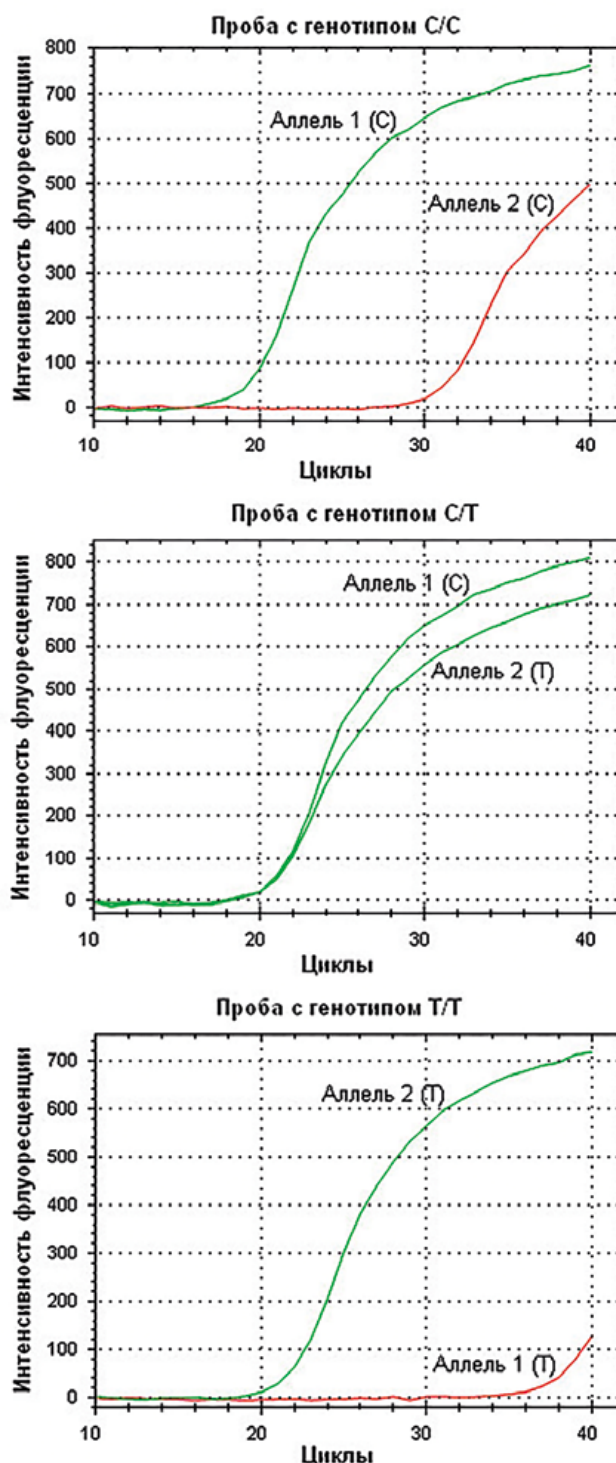


Рисунок. Пример детекции разных вариантов генотипов rs17185536.

Таблица 2
Частота встречаемости однонуклеотидного полиморфизма rs17185536 среди обследованных групп пациентов

Генотип	Группа контроля Количество, абс. (%)	ИП Количество, абс. (%)	ЭТ Количество, абс. (%)	МФ Количество, абс. (%)	Все ХМПЗ
Всего проб	81	25	29	29	83
С/С	53 (65%)	16 (64%)	21 (73%)	24 (83%)	61 (73%)
С/Т	25 (31%)	7 (28%)	7 (24%)	5 (17%)	19 (23%)
Т/Т	3 (4%)	2 (8%)	1 (3%)	0	3 (4%)
Аллель С	131 (81%)	39 (78%)	49 (85%)	53 (91%)	141 (85%)
Аллель Т	31 (18%)	11 (22%)	9 (15%)	5 (9%)	25 (15%)

Таблица 3
Распределение аллельных вариантов rs17185536 у беременных; количество абс., (%)

Генотип	Беременные без патологий; кол-во абс., (%) -1-		Беременные объединенной группы патологии; кол-во абс., (%) -2-	
Всего проб	41		59	
Аллель С	76 (93%)		88 (75%)	
Аллель Т	6 (7%)		30 (25%)	
Отношение шансов (с группой контроля)	Аллель С 2,61 (1,08–6,28)	Аллель Т 0,38 (0,16–0,92)	Аллель С 0,6 (0,36–1,0)	Аллель Т 1,66 (1,00–2,74)
Р	0,03		0,05	
Отношение шансов (между группами 1 и 2)	Аллель С 0,23 (0,09–0,59)		Аллель Т 4,32 (1,71–10,93)	
Р			0,001	

Обсуждение

Основанием для проведения настоящей работы послужили данные о роли полиморфизма некодирующего участка ДНК rs17185536 в регуляции экспрессии топографически ассоциированных генов *SIM-1*, *MCHR2*, *CCNC*, *PRDM13* и *USP45*. Продукт гена *SIM1* участвует в регуляции меланокортинового пути, который отвечает как за пищевое, так и половое поведение млекопитающих, в то время как гены циклина С, метилтрансфераза гистонов и убиквитин-специфической пептидазы известны своим участием в регуляции репарации ДНК и клеточного цикла. Последнее давало повод для исследования возможной роли rs17185536 как фактора риска развития патологии беременности и (или) онкогематологических заболеваний.

Полученные в нашей работе данные о распространенности аллеля Т полиморфизма rs17185536 среди всех обследованных пациентов г. Красноярска соответствуют данным о распространенности данного полиморфизма в международном исследовании [5]. Отсутствие статистически значимых различий частоты встречаемости данного полиморфизма при хронических миелопролиферативных заболеваниях свидетельствует о низкой вероятности вовлечения rs17185536-Т в патогенез выбранных нами заболеваний. В группе беременных женщин показана ассоциация аллеля rs17185536-Т с ожирением, миомой матки и развитием преэклампсии.

Вместе с тем мы подтвердили наличие в российской популяции сопоставимой распространенности гена наследственной предрасположенности к импотенции. Информацию о носительстве полиморфизма риска ранней эректильной дисфункции важно учитывать в диагностике сексуальных расстройств, также при назначении лекарственных препаратов с высоким риском побочного влияния на данную функцию. Дальнейшее исследование функции гена *SIM1* будет способствовать разработке персонализированных препаратов для профилактики и лечения импотенции.

Заключение

В результате настоящей работы разработан набор реагентов для определения полиморфизма rs17185536 гена *SIM1* с применением метода ПЦР-РВ и определена распространенность данного полиморфизма у жителей г. Красноярска. Было установлено, что в целом по всем группам обследованных пациентов распределение частот встречаемости аллельных вариантов полиморфизма rs17185536 не отличается от распространенности, определенной в международных исследованиях. Впервые показана ассоциация rs17185536-Т с наличием миомы матки, ожирением II–III степени и развитием преэклампсии у беременных. Полученные данные требуют дополнительного подтверждения на более обширной выборке.

Источник финансирования: ООО «Формула гена» (www.formulagena.ru). В работе было использовано оборудование: ФИЦ КНС СО РАН Сибирского федерального университета.

Авторы подтверждают, что статья или ее части ранее не были опубликованы.

Список литературы

- Winkler TW, Justice AE, Graff M, et al. The Influence of Age and Sex on Genetic Associations with Adult Body Size and Shape: A Large-Scale Genome-Wide Interaction Study. // *PLoS Genet.* — 2015. — Vol. 11, N 10. — e1005378. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005378.
- Teumer A, Chaker L, Groeneweg S, et al. Genome-wide analyses identify a role for SLC17A4 and AADAT in thyroid hormone regulation. // *Nat Commun.* — 2018. — Vol. 9, N 1. — P. 4455.
- Bhasin, Manoj K., John W. et al. Specific Transcriptome Changes Associated With Blood Pressure Reduction In Hypertensive Patients After Relaxation Response Training. // *The Journal Of Alternative And Complementary Medicine.* — Vol. 24, N 5. P. 486–504.
- Ceppi M, Clavarino G, Gatti E et al. Ribosomal protein mRNAs are translationally-regulated during human dendritic cells activation by LPS. // *Immunome Res.* — 2009. Vol. 5, N 1. — P. 5.
- Jorgenson E, Matharu N, Palmer MR, et al. Genetic variation in the *SIM1* locus is associated with erectile dysfunction. // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2018. — Vol. 115, N 43. — P. 11018–11023.
- El Khattabi L, Guimiot F, Pipiras E, et al. Incomplete penetrance and phenotypic variability of 6q16 deletions including *SIM1*. // *Eur J Hum Genet.* — 2014. — Vol. 23, N 8. — P. 1010–8.
- Chromosome 6. atlasgeneticsoncology.org. atlasgeneticsoncology.org/Bands/6q16.html. Published 2019. Последнее обращение 13.02.2019.
- WASP. [bioinfo.biotech.or.th/WASP/](http://bioinfo.biotech.or.th/bioinfo.biotech.or.th/WASP/). Published 2019. Последнее обращение 13.02.2019.

Для цитирования. Горбенко А. С., Столяр М. А., Комаровский Ю. Ю., Михалев М. А., Потылицина В. В., Васильев Е. В., Ольховский И. А. Разработка метода обнаружения однонуклеотидной замены в некодирующем локусе ДНК rs17185536: потенциальное диагностическое значение // *Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория».* — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 11–14.



Особенности гемопоэза у новорожденных с признаками морфофункциональной незрелости

И. Б. Барановская, к.б.н., биолог

О. Ф. Самохина, биолог клинико-диагностической лаборатории

Н. В. Бойко, к.м.н., врач-неонатолог, зав. отделением патологии новорожденных

И. П. Сысоева, врач-лаборант, зав. клинико-диагностической лабораторией

ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», г. Краснодар

Features of hematopoiesis in newborns with signs of morphofunctional immaturity

I. B. Baranovskaya, O. F. Samokhina, N. V. Boyko, I. P. Sysoeva

Regional Clinical Hospital No. 2, Krasnodar, Russia

Резюме

Целью настоящей работы было выявление особенностей гемопоэза у новорожденных 1–7-го дней жизни с признаками морфофункциональной незрелости. Были сформированы три группы новорожденных: 1 — здоровые доношенные (контрольная); 2 — доношенные, но маловесные для гестационного возраста; 3 — недоношенные (срок гестации 34–36 недель) с признаками недостаточности питания. На анализаторе Sysmex XN проанализированы традиционные показатели гемограммы, включая ретикулоцитарные параметры, а также расчетный индекс — показатель эффективности эритропоэза (ЭЭ). Всего исследовано 714 образцов крови. Анализировались следующие статистические показатели: среднее значение (M), среднее стандартное квадратичное отклонение (Sd), ошибка среднего значения ($St\ er$). Статистическая значимость межгрупповых различий устанавливалась на основе критерия Мани-Уитни ($p \leq 0,05$). Сравнительный межгрупповой анализ показал отсутствие статистически значимых различий ($p \geq 0,05$) между базовыми показателями красной крови (гемоглобин, эритроциты, гематокрит и др.) новорожденных контрольной группы и детей с признаками морфофункциональной незрелости. Согласно полученным данным, у новорожденных в доношенном сроке, но маловесных для гестационного возраста (2-я группа), имелась тенденция к снижению содержания ретикулоцитов и их незрелых фракций, показателя эффективности эритропоэза, индекса продукции ретикулоцитов. Недоношенные дети с признаками недостаточности питания (3-я группа) отличались от контрольной группы статистически значимым ($p \leq 0,05$) увеличением содержания ретикулоцитов (на 2–3-и сутки), индекса их продукции (на 2-е сутки), а также показателя эффективности эритропоэза (на 2–3-и сутки). При этом у недоношенных младенцев зарегистрировано статистически значимое уменьшение содержания лейкоцитов (1-е и 4-е сутки), нейтрофилов (4-е сутки) и лимфоцитов (3-и сутки).

Ключевые слова: новорожденные, морфофункциональная незрелость, недостаточность питания, недоношенность, эффективность эритропоэза, ретикулоциты, лейкоциты.

Summary

The purpose of this work was to identify the characteristics of hematopoiesis in newborns of 1–7th days of life with signs of morphofunctional immaturity. Three groups of newborns were formed: 1) healthy full-term babies (control); 2) full-term, but low-weight for gestational age children; 3) premature babies (gestational age 34–36 weeks) with signs of malnutrition. On the Sysmex XN analyzer, traditional hemogram indicators were analyzed, including reticulocyte parameters, as well as a calculated index — an indicator of erythropoiesis (EE) effectiveness. A total of 714 blood samples were examined. The following statistical characteristics of the indicators were analyzed: mean value (M), mean standard square deviation (Sd), error of the mean value ($St\ er$). The statistical significance of intergroup differences was established on the basis of the Money-Whitney test ($p \leq 0.05$). Comparative intergroup analysis showed no statistically significant differences ($p \geq 0.05$) between the baseline red blood values (hemoglobin, erythrocytes, hematocrit, etc.) in the control newborns and children with signs of morphofunctional immaturity. According to the data obtained in newborns in the full-term, but low-weight for gestational age (group 2), there was a tendency to a decrease in the content of reticulocytes and their immature fractions, an indicator of the erythropoiesis efficiency, an index of reticulocyte production. Premature infants with signs of malnutrition (group 3) differed from the control group in a statistically significant ($p \leq 0.05$) increase in the content of reticulocytes (by 2–3 days), an index of their production (by 2 days), and also an indicator of erythropoiesis (on 2–3 days). At the same time, a statistically significant decrease in the content of leukocytes (1st and 4th days), neutrophils (4th day) and lymphocytes (3rd day) was registered in premature babies.

Key words: newborns, morphofunctional immaturity, malnutrition, prematurity, erythropoiesis efficiency, reticulocytes, leukocytes.

Известно, что, по сравнению с детьми более старшего возраста, картина крови новорожденных первых дней жизни отличается рядом особенностей. Прежде всего, это физиологические эритроцитоз, ретикулоцитоз и лейкоцитоз, что обусловлено адаптивно-приспособительными реакциями гемопоэза к внеутробным условиям существования. Следует отметить, что амплитуда подобных колебаний может быть очень высока даже у здоровых доношенных новорожденных (например, на фоне перинатальной гипоксии при неблагоприятном

течении родов) [1], что обуславливает сложности интерпретации показателей общего анализа крови в раннем неонатальном периоде.

Еще больше вопросов возникает при трактовке результатов гемограмм новорожденных с признаками морфофункциональной незрелости (недоношенность, гипотрофия). Имеющиеся в этом плане данные касаются преимущественно детей с экстремально низкой массой тела [2] и недоношенных с отягощенным анамнезом (полиорганная недостаточность, гипоксия, бактериальное

инфицирование) [3–5]. При этом за рамками научных исследований остаются особенности кроветворения новорожденных первых дней жизни с пограничными состояниями (незначительно выраженные признаки морфофункциональной незрелости). Речь идет о так называемых поздних недоношенных детях, родившихся на 34–36-й неделе гестации [6] и младенцах с умеренным снижением массо-ростовых параметров по сравнению с нормативными. Такие дети, даже при удовлетворительном функциональном состоянии при рождении, входят в группу риска по развитию состояния дизадаптации [2, 7].

Поздние недоношенные дети, как правило, являются физиологически и метаболически незрелыми к моменту рождения, и их способность к регуляции физиологических процессов во внеутробных условиях несовершенна [6]. Группа детей с гипотрофией крайне гетерогенна. У части из них снижение массы и роста может быть обусловлено конституционными особенностями. Однако все же в большей степени развитие синдрома задержки развития плода связано с хронической плацентарной недостаточностью и интоксикацией плода при отягощенном акушерско-гинекологическом анамнезе матери [8].

Принято считать, что любые изменения гематологического фона связаны с базовым клиническим статусом новорожденного. Но все ли ростки кроветворения затрагивают подобные сдвиги, и какова их выраженность? Остается нерешенным вопрос о компенсаторных возможностях эритрона на фоне недостаточного развития кроветворных органов.

Анализ современной литературы показал, что в настоящее время не существует единой точки зрения о влиянии морфофункциональной незрелости на систему гемопоза новорожденного. Выявление и корректное использование лабораторных маркеров в качестве дополнительных индикаторов перинатальных исходов у детей с признаками морфофункциональной незрелости могут оказать существенную помощь врачу-неонатологу при принятии клинического решения.

Цель работы: выявить особенности гемопоза у новорожденных с признаками морфофункциональной незрелости.

Материалы и методы

Исследование производилось на базе перинатального центра ККБ № 2 г. Краснодара. Ретроспективно на основе данных историй болезни были сформированы три группы новорожденных:

- первая группа (контрольная) — 357 здоровых доношенных новорожденных (масса $3612,0 \pm 16,7$ г, рост $53,90 \pm 0,14$ см, оценка по шкале Апгар — 7–9 баллов);
- вторая группа — 270 доношенных новорожденных с гипотрофией 1–2-й степени (масса $2811,00 \pm 18,72$ г, рост $49,7 \pm 0,19$ см, оценка по шкале Апгар — 7–9 баллов);
- третья группа — 87 недоношенных новорожденных с гипотрофией (срок гестации 34–36 недель, масса $2589,00 \pm 22,69$ г, рост $48,03 \pm 0,15$ см, оценка по шкале Апгар — 6–8 баллов).

Оценка массо-ростовых параметров новорожденных производилась по центильным таблицам.

Образцы капиллярной крови детей 1–7 дней жизни исследовались на анализаторе Sysmex XN, производящего в рутинном режиме 36 показателей.

Путем сравнительного межгруппового анализа были отобраны параметры, различия между значениями которых были статистически значимы и (или) имели четкую тенденцию. Таким образом, в работе представлены данные, касающиеся следующих показателей общего анализа крови: относительное количество ретикулоцитов (Ret%), содержание незрелых ретикулоцитов (IRF%), индекс созревания ретикулоцитов (RPI), дельта-гемоглобин (D-He, пг), содержание лейкоцитов (WBC, $10^9/\text{л}$), относительное и абсолютное содержание лимфоцитов (Lymph% и Lymph, $10^9/\text{л}$), относительное и абсолютное содержание нейтрофилов (Neut% и Neut, $10^9/\text{л}$).

Помимо традиционных параметров гемограммы, был проанализирован показатель эффективности эритропоэза (ЭЭ), рассчитанный по методике Е. Н. Мосягиной (1976) [9]. ЭЭ представляет собой отношение количества ретикулоцитов в 1 мкл крови ко времени созревания ретикулоцитов (в сутки). Нормативные значения ЭЭ для лиц взрослого возраста, по данным Е. Н. Мосягиной, составляют 60–80 тыс. эритроцитов в 1 мкл в сутки.

Статистическая обработка данных производилась с помощью программ Statistica 7 и Excell 2003. Исследовались следующие статистические характеристики анализируемых параметров: среднее значение (M), среднее стандартное квадратичное отклонение (Sd), ошибка среднего значения (St er). Статистическая значимость межгрупповых различий устанавливалась на основе критерия Мани-Уитни ($p \leq 0,05$).

Результаты

Согласно результатам исследования, основные показатели красной крови (гемоглобин, количество эритроцитов, гематокрит, средний объем эритроцитов и др.) статистически значимо не различались у здоровых доношенных детей и новорожденных с умеренно выраженными признаками морфофункциональной незрелости ($p > 0,05$). Тем не менее у недоношенных новорожденных (группа 3) по сравнению с контрольной группой (группа 1) зарегистрирована тенденция к повышению гемоглобина (HGB), количества эритроцитов (RBC), гематокрита (Hct), среднего объема эритроцитов (MCV), средней концентрации гемоглобина в эритроцитах (MCH) в течение 24 часов после рождения. Аналогичные результаты были получены в более ранних исследованиях [10–12], где авторы связывают активацию эритропоэза у новорожденных малого гестационного срока с хронической гипоксией плода на фоне плацентарной недостаточности.

По сравнению с эритроцитарными параметрами ретикулоцитарные показатели (и рассчитанный на их основе показатель эффективности эритропоэза) проявили себя как более реактивные: именно среди них зарегистрированы статистически значимые отличия и (или) устойчивые тенденции, связанные с морфофункциональным состоянием новорожденных (табл. 1).

Таблица 1

Ретикулоцитарные показатели в зависимости от морфофункционального состояния новорожденных

Показатели	Дни	Здоровые доношенные новорожденные (1-я группа)	Доношенные новорожденные с гипотрофией (2-я группа)	Недоношенные новорожденные с гипотрофией (3-я группа)
		M ± St er (Sd)		
Эффективность эритропоэза, (количество эритроцитов в 1 мкл крови в сутки)	1-й	42,01 ± 4,55 (26,56)	32,99 ± 3,61 (15,31)	32,52 ± 5,21 (10,42)
	2-й	25,84 ± 1,21 (8,64)**	31,12 ± 3,85 (18,04)	33,36 ± 2,32 (6,96)**
	3-й	31,17 ± 3,06 (31,49)**	22,97 ± 2,46 (11,29)	38,16 ± 7,45 (16,66)**
	4-й	31,42 ± 13,22 (99,83)*	18,11 ± 0,50 (21,52)*	24,06 ± 8,88 (25,11)
	5-й	12,16 ± 2,68 (23,67)	8,20 ± 1,64 (8,05)	6,39 ± 0,95 (2,69)
	6-й	4,02 ± 0,57 (4,26)	4,25 ± 1,27 (5,97)	3,86 ± 1,21 (3,83)
	7-й	5,39 ± 0,50 (15,69)	2,17 ± 0,29 (1,38)	1,74 ± 0,48 (1,44)
Ret%	1-й	5,35 ± 0,31 (1,83)*	4,44 ± 0,26 (1,12)*	4,59 ± 0,53 (1,07)
	2-й	4,39 ± 0,15 (1,05)**	4,50 ± 0,24 (1,11)	5,11 ± 0,28 (0,85)**
	3-й	4,28 ± 0,15 (1,59)**	3,91 ± 0,20 (0,90)***	5,19 ± 0,40 (0,90)** ***
	4-й	2,89 ± 0,13 (0,95)	2,69 ± 0,50 (0,96)	3,63 ± 0,80 (2,27)
	5-й	2,14 ± 0,10 (0,92)	1,99 ± 0,14 (0,72)	2,11 ± 0,22 (0,62)
	6-й	1,49 ± 0,08 (0,59)	1,46 ± 0,14 (0,67)	1,49 ± 0,27 (0,85)
	7-й	1,34 ± 0,50 (0,75)	1,20 ± 0,09 (0,41)	1,22 ± 0,25 (0,74)
RPI	1-й	6,29 ± 0,30 (1,75)	4,44 ± 0,26 (1,12)	4,59 ± 0,53 (1,07)
	2-й	5,13 ± 0,17 (1,24)**	5,71 ± 0,57 (2,68)	5,75 ± 0,19 (0,57)**
	3-й	5,57 ± 0,34 (3,48)	4,65 ± 0,25 (1,16)	6,24 ± 0,80 (1,78)
	4-й	7,10 ± 2,06 (15,53)	4,61 ± 0,50 (3,98)	5,19 ± 1,56 (4,40)
	5-й	3,99 ± 0,49 (4,36)	3,05 ± 0,41 (2,00)	2,55 ± 0,20 (0,56)
	6-й	2,33 ± 0,29 (2,19)	2,17 ± 0,34 (1,59)	1,85 ± 0,37 (1,16)
	7-й	2,47 ± 0,50 (4,99)	1,63 ± 0,18 (0,83)	1,22 ± 0,17 (0,51)
IRF, %	1-й	37,86 ± 1,56* (9,10)	30,68 ± 1,80* (7,65)	33,33 ± 3,93 (7,85)
	2-й	26,51 ± 0,97 (6,96)	26,27 ± 1,42 (6,66)	27,47 ± 2,03 (6,08)
	3-й	22,60 ± 0,75 (7,75)	21,60 ± 1,44 (6,60)	22,08 ± 3,12 (6,97)
	4-й	17,86 ± 0,88 (6,65)* **	13,99 ± 0,50 (6,95)* ***	20,20 ± 3,12 (8,83)** ***
	5-й	15,65 ± 0,84 (7,50)	14,10 ± 1,59 (7,95)	13,80 ± 2,34 (6,63)
	6-й	13,22 ± 0,86 (6,41)	11,04 ± 1,34 (6,30)	8,94 ± 1,70 (5,38)
	7-й	14,91 ± 0,50 (6,96)	12,30 ± 1,00 (4,71)	13,19 ± 1,82 (5,46)

Примечание: различия статически значимы (группы I-II*, I-III**, II-III***). Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия (p < 0,05).

В табл. 1 представлены результаты динамического анализа избранных ретикулоцитарных показателей.

Согласно полученным данным (табл. 1), при рождении (1-й день жизни) и к концу периода наблюдения (7-й день жизни) максимально высокие абсолютные значения показателя эффективности эритропоэза зарегистрированы у здоровых доношенных новорожденных (1-я группа). Рис. 1 демонстрирует сравнительную динамику показателя ЭЭ.

В соответствии с табл. 1 и рис. 1 у доношенных, но маловесных для гестационного возраста детей (группа 2)

на 3–5-е сутки зарегистрированы наименьшие значения показателя эффективности эритропоэза по сравнению с новорожденными 1-й и 3-й групп. У недоношенных детей с признаками недостаточности питания (группа 3) максимально высокое производство эритроцитов зарегистрировано на 2–3-й дни жизни (различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, p ≤ 0,05). Начиная с 4-го дня жизни значения показателя ЭЭ достоверно не различались у здоровых новорожденных и детей с признаками морфофункциональной незрелости.

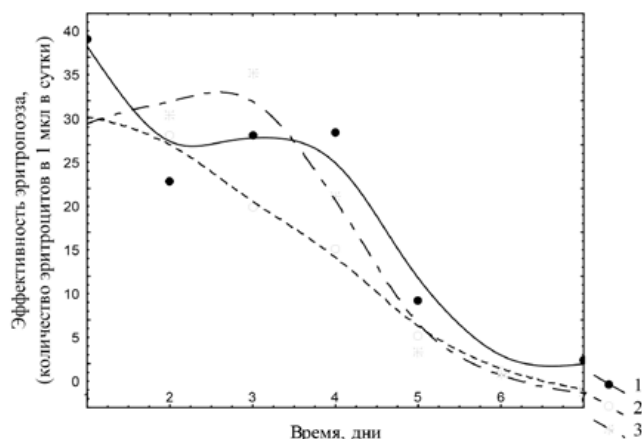


Рисунок 1. Динамика показателя эффективности эритропоэза у детей первых дней жизни: 1 — здоровые доношенные новорожденные; 2 — доношенные новорожденные с гипотрофией; 3 — недоношенные новорожденные с гипотрофией.

В целом в течение анализируемого периода (1–7-й дни жизни) эффективность эритропоэза у недоношенных новорожденных на 15 % выше, чем у детей контрольной группы, что может быть обусловлено компенсаторной активацией кроветворения в условиях гипоксии.

Рис. 2 и 3 демонстрируют результаты динамического мониторинга, касающиеся процентного содержания ретикулоцитов (Ret%) и индекса их продукции (RPI).

Согласно данным табл. 1 и рис. 2, 3, в изменениях значений анализируемых показателей (Ret% и RPI) отсутствует линейная зависимость. Данное обстоятельство обусловлено тем, что RPI, как расчетный индекс, зависит не только от количества ретикулоцитов, но и от времени их созревания (то есть, степени зрелости), а также от гематокрита.

Итак, у доношенных здоровых новорожденных (группа 1) пик ретикулоцитоза приходится на 1-й день жизни, в то время как скорость продукции Ret максимальна на 4-й день. Вероятно, отсутствие сопряженности между Ret% и RPI обусловлено тем, что скорость созревания ретикулоцитов до эритроцитов выше скорости их продукции.

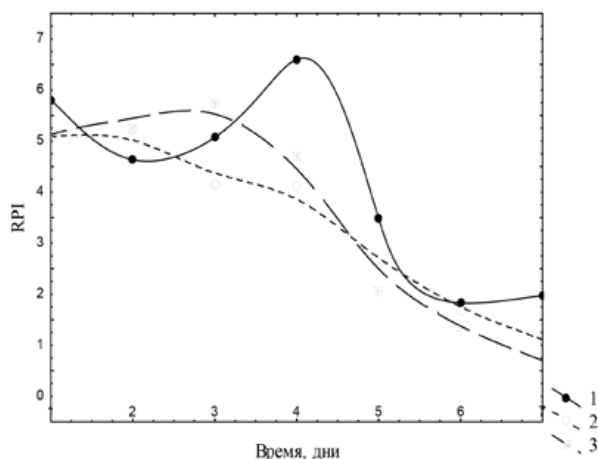


Рисунок 3. Динамика индекса продукции ретикулоцитов (RPI) у детей первых дней жизни: 1 — здоровые доношенные новорожденные; 2 — доношенные новорожденные с гипотрофией; 3 — недоношенные новорожденные с гипотрофией.

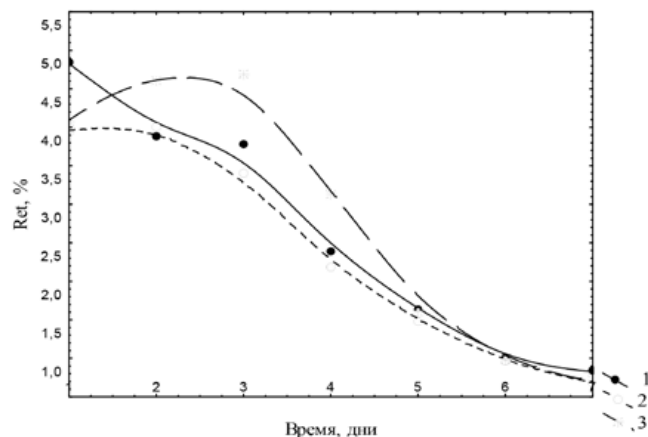


Рисунок 2. Динамика содержания ретикулоцитов (Ret%) у детей первых дней жизни: 1 — здоровые доношенные новорожденные; 2 — доношенные новорожденные с гипотрофией; 3 — недоношенные новорожденные с гипотрофией.

У доношенных, но маловесных для гестационного возраста детей (группа 2) пик и ретикулоцитоза, и RPI пришелся на 2-й день жизни. При этом на 1-й день зарегистрировано статистически значимое уменьшение показателя Ret по сравнению с детьми контрольной группы, а на 3-й — по сравнению с недоношенными новорожденными ($p < 0,05$). Вероятно, речь идет о сниженной активации кроветворения в условиях недостаточности питания, а значит, дефицита пластических веществ для синтеза клеток красной крови.

Согласно полученным данным, у недоношенных новорожденных с признаками недостаточности питания (группа 3) пик ретикулоцитоза (Ret%) и максимально высокое производство ретикулоцитов (RPI) зарегистрированы на 2–3-е сутки жизни. Четкая сопряженность между анализируемыми показателями может свидетельствовать о мобилизации резервов адаптации кроветворения в условиях функциональной незрелости системы крови.

В табл. 1 приводятся результаты анализа, касающиеся динамики ретикулоцитов незрелых фракций (IRF%). Согласно полученным данным, в целом динамика IRF%

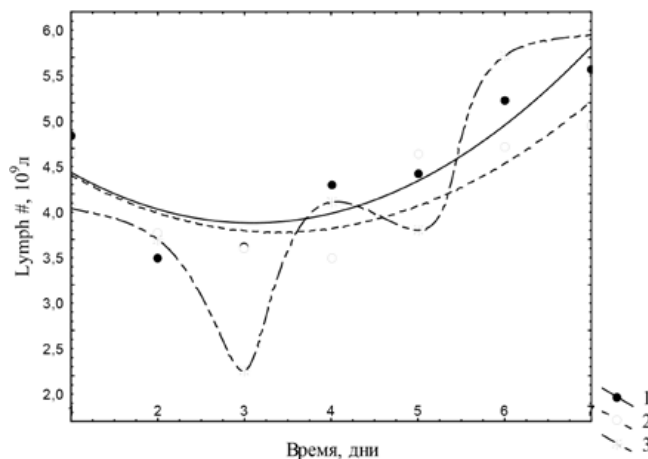


Рисунок 4. Динамика абсолютного содержания лимфоцитов у детей первых дней жизни: 1 — здоровые доношенные новорожденные; 2 — доношенные новорожденные с гипотрофией; 3 — недоношенные новорожденные с гипотрофией.

Таблица 2

Лейкоцитарные показатели новорожденных (в зависимости от морфофункционального состояния при рождении)

Показатели	Дни	Здоровые доношенные новорожденные (1-я группа)	Доношенные новорожденные с гипотрофией (2-я группа)	Недоношенные новорожденные с гипотрофией (3-я группа)
		M ± St er (Sd)		
WBC, 10 ⁹ /л	1-й	22,49 ± 1,13** (6,85)	21,39 ± 1,38 (5,67)	18,21 ± 2,60** (5,20)
	2-й	13,42 ± 0,53 (3,85)	13,72 ± 0,70 (3,30)	14,50 ± 0,89 (2,67)
	3-й	12,10 ± 0,32 (3,28)	12,27 ± 0,69 (3,16)	11,57 ± 0,91 (2,04)
	4-й	12,18 ± 0,42 (3,14)**	10,16 ± 0,50 (2,05)	9,93 ± 0,65 (1,83)**
	5-й	11,64 ± 0,31 (2,75)	12,03 ± 0,50 (2,52)	10,09 ± 0,97 (2,74)
	6-й	12,99 ± 0,62 (4,61)	10,97 ± 0,55 (2,59)	13,61 ± 1,05 (3,31)
	7-й	12,99 ± 0,50 (3,62)	11,30 ± 0,56 (2,63)	12,31 ± 0,71 (2,13)
Lymph%	1-й	24,51 ± 1,30 (7,49)	23,97 ± 1,47 (6,22)	25,08 ± 4,02 (8,04)
	2-й	28,54 ± 0,92 (6,55)	29,85 ± 1,45 (6,81)	28,51 ± 2,53 (7,60)
	3-й	33,02 ± 0,77 (7,90)**	32,60 ± 1,33 (6,08)***	22,18 ± 2,48 (5,54)**. ***
	4-й	37,88 ± 1,05 (7,91)	37,30 ± 0,50 (7,59)	44,61 ± 4,06 (11,47)
	5-й	40,95 ± 0,83 (7,35)	41,25 ± 1,76 (8,80)	38,89 ± 3,04 (8,03)
	6-й	44,17 ± 1,20 (9,00)	45,99 ± 1,39 (6,51)	44,06 ± 3,15 (9,96)
	7-й	45,88 ± 0,50 (9,35)	46,98 ± 1,03 (4,73)	51,84 ± 3,55 (10,66)
Lymph, 10 ⁹ /л	1-й	5,13 ± 0,24 (1,37)	4,94 ± 0,32 (1,34)	4,34 ± 0,47 (0,93)
	2-й	3,79 ± 0,16 (1,15)	4,08 ± 0,27 (1,28)	4,00 ± 0,27 (0,82)
	3-й	3,91 ± 0,11 (1,16)**	3,91 ± 0,18 (0,80)***	2,55 ± 0,33 0,73)**. ***
	4-й	4,61 ± 0,20 (1,50)*	3,80 ± 0,50 (1,11)*	4,41 ± 0,48 (1,35)
	5-й	4,72 ± 0,14 (1,23)	4,93 ± 0,27 (1,33)	4,10 ± 0,54 (1,42)
	6-й	5,52 ± 0,18 (1,35)	5,02 ± 0,28 (1,30)	6,02 ± 0,71 (2,23)
	7-й	5,86 ± 0,50 (1,41)	5,25 ± 0,27 (1,24)	6,25 ± 0,35 (1,04)
Neut%	1-й	62,46 ± 1,52 (8,76)	63,37 ± 2,19 (9,29)	61,50 ± 4,04 (8,09)
	2-й	53,35 ± 1,16 (8,26)	52,36 ± 1,52 (7,13)	54,91 ± 2,09 (6,28)
	3-й	45,57 ± 0,88 (9,03)	48,55 ± 1,85 (8,49)	55,66 ± 5,19 (11,59)
	4-й	39,39 ± 1,16 (8,76)**	38,73 ± 0,50 (9,36)	31,96 ± 3,69 (10,43)**
	5-й	35,13 ± 0,82 (7,32)	34,54 ± 1,78 (8,90)	38,97 ± 3,31 (8,76)
	6-й	34,49 ± 1,21 (9,06)	31,35 ± 1,76 (8,25)	33,63 ± 3,32 (10,50)
	7-й	31,65 ± 0,50 (9,34)	29,15 ± 1,01 (4,62)	27,34 ± 2,41 (7,23)
Neut, 10 ⁹ /л	1-й	13,89 ± 0,86 (4,94)	13,85 ± 1,16 (4,94)	11,46 ± 2,28 (4,56)
	2-й	7,34 ± 0,35 (2,50)	7,24 ± 0,47 (2,19)	8,03 ± 0,75 (2,25)
	3-й	5,63 ± 0,20 (2,05)*	6,08 ± 0,54 (2,47)*	6,54 ± 0,98 (2,19)
	4-й	4,84 ± 0,24 (1,82)**	3,91 ± 0,50 (1,22)	3,24 ± 0,47 (1,33)**
	5-й	4,18 ± 0,18 (1,61)	4,22 ± 0,34 (1,70)	4,18 ± 0,61 (1,61)
	6-й	4,75 ± 0,50 (3,72)	3,46 ± 0,28 (1,29)	4,65 ± 0,65 (2,04)
	7-й	4,21 ± 0,50 (2,19)	3,31 ± 0,22 (0,99)	3,48 ± 0,49 (1,46)

Примечание: различия статически значимы (группы I-II*, I-III**, II-III***). Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия (p < 0,05).

сопряжена с содержанием ретикулоцитов. При этом установлено, что в условиях гипотрофии (группа 2) имеет место тенденция (в ряде случаев достигающая статистически значимых значений) к снижению процента незрелых ретикулоцитов. Выявленная закономерность еще раз свидетельствуют о более низкой активности эритропоэза у новорожденных 2-й группы по сравнению со здоровыми и недоношенными детьми. Полученные нами данные не подтверждают точку зрения об отсутствии взаимосвязи IRF% с функциональным состоянием новорожденных [13].

В табл. 2 представлены результаты анализа лейкоцитарных показателей, в отношении которых зарегистрированы достоверные межгрупповые различия.

В соответствии с табл. 2 установлено статистически значимое снижение основных показателей лейкоцитопоза у недоношенных детей (группа 3) по сравнению с контрольной группой (группа 1), что согласуется с известными литературными данными [14]. Так, в условиях недоношенности достоверно более низкое количество лейкоцитов зарегистрировано на 1-е и 4-е сутки жизни, лимфоцитов — на 3-и сутки, нейтрофилов — на 4-е сутки жизни. Рис. 4 в качестве примера демонстрирует сравнительную динамику абсолютного содержания лимфоцитов.

В соответствии с рис. 4 динамика показателя Lymph% практически идентична у доношенных детей 1-й и 2-й групп. Что касается функции, аппроксимирующей результаты измерений лимфоцитов недоношенных новорожденных, то она имеет колебательный характер с минимальным экстремумом ($\downarrow$) на 3-й день жизни. При этом у новорожденных с доношенным гестационным сроком (группа 2) умеренно выраженная недостаточность питания не оказывает значимого влияния на лейкоцитопоз.

Качественные изменения лейкоцитарного роста кроветворения, зарегистрированные у недоношенных новорожденных, вероятно, обусловлены морфофункциональной незрелостью иммунной системы в целом и лимфоидной ткани в частности.

Выводы

1. При умеренно выраженной морфофункциональной незрелости (недоношенность 34–36 недель и [или] маловесность для гестационного возраста) базовые показатели красной крови (гемоглобин, содержание эритроцитов, гематокрит и др.) достоверно не различаются от референтных величин здоровых доношенных новорожденных.
2. У доношенных, но маловесных для гестационного возраста детей по сравнению с новорожденными контрольной группы зарегистрирована тенденция к снижению содержания ретикулоцитов (на 1-е и 3-и сутки), а также статистически значимое ($p < 0,05$) уменьшение количества незрелых ретикулоцитов (на 4-е сутки) и показателя эффективности эритропоэза (на 4-е сутки).

3. Согласно результатам сравнительного анализа, у недоношенных новорожденных с недостаточностью питания по сравнению с детьми контрольной группы имело место статистически значимое ($p < 0,05$) повышение активности эритропоэза: увеличение количества ретикулоцитов (на 2–3-и сутки) и индекса их продукции (на 2-е сутки), а также показателя эффективности эритропоэза (на 2–3-и сутки).
4. По сравнению с детьми контрольной группы у недоношенных новорожденных достоверно снижены ($p < 0,05$) значения следующих показателей лейкоцитопоза:
 - содержания лейкоцитов (на 1-е и 4-е сутки);
 - абсолютного и относительного количества лимфоцитов (на 3-и сутки);
 - абсолютного и относительного содержания нейтрофилов (на 4-е сутки).

Список литературы

1. Заплатников А.А. Трактовка клинического анализа крови. 1. показатели красной крови // Вопросы практической педиатрии. 2011. Т. 6. № 6. С. 66–71.
2. Чистякова Г.Н., Тарасова М.Н., Газиева И.А., Ремизова И.И., Чарипова Б.Т. Оценка параметров эритропоэза и феррокинетики у детей, родившихся с экстремально низкой массой тела // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 12. С. 16–19.
3. Серебрякова Е.Н., Волосников Д.К., Рыжкова А.И. Оценка эритропоэза у новорожденных с синдромом полиорганной недостаточности // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2012. № 2. С. 12–17.
4. Исмаилова М.А., Маткурбанова Д.Д. Особенности гемопоэза у недоношенных новорожденных, перенесших гипоксию и бактериальную инфекцию // Успехи современного естествознания. 2013. № 9. С. 39–46.
5. Mouna K., Doddagowda SM, Junjgowda K, Krishnamurthy L. Changes in Haematological Parameters in Newborns Born to Preeclamptic Mothers — A Case Control Study in a Rural Hospital // J Clin Diagn Res. 2017 Jul; 11 (7): EC 26—EC 29. DOI: 10.7860/JCDR/2017/29137.10303. Epub 2017 Jul 1.
6. Логвинова И.И., Иванова Н.И., Малюкова О.С., Каледина Е.Я., Хатунцев А.В., Кривошеева Е.В. Особенности ранней адаптации у поздних недоношенных детей // В сборнике: Scientific achievements of the third millennium Collection of scientific papers on materials V International Scientific Conference. International Research Federation 'Science Public'. 2017. С. 50–52.
7. Макаров О.В., Салихова И.Р., Озимковская Е.П., Зорина Т.П. Морфофункциональная незрелость доношенных новорожденных. Современное состояние проблемы // Вестник РГМУ. 2009. № 4. С. 42–46.
8. Будюхина О.А. Синдром задержки развития плода — современный взгляд на проблему (обзор литературы) Проблемы здоровья и экологии. 2009. № 1 (19). С. 83–89.
9. Барановская И.Б., Напсо А.И., Сысоева И.П. Наследственные гемолитические анемии в практике не специализированной клинко-диагностической лаборатории // Поликлиника. 2017. № 4–1. С. 10–14.
10. Nunes MF, Assis AM, Pinheiro SM, da Rocha MF. Erythrocyte indices and serum ferritin in newborns. Rev Bras Hematol Hemoter. 2010; 32: 365–70.
11. Patidar S, Shrivastava J, Agrawal A, Dwivedi R. Assessment of iron status and red cell parameters in healthy full term small for gestational age neonates at birth // J Clin Neonatol. 2013 Jul; 2 (3): 121–4. DOI: 10.4103/2249-4847.119995.
12. Mukhopadhyay K, Yadav RK, Kishore SS, Garewal G, Jain V, Narang A. Iron status at birth and at 4 weeks in term small-for-gestation infants in comparison with appropriate-for-gestation infants // J Matern Fetal Neonatal Med. 2011; 24: 886–90.
13. Redzko S., Przepiesc J, Zak J, Turowski D, Urban J, Wysocka J. Cord blood reticulocytes and reticulocyte subtypes in normal and complicated pregnancy // Med Wieku Rozwoj. 2002. Apr-Jun; 6 (2): 145–53.
14. Ozyürek E I, Cetintaş S, Ceylan T, Oğuş E, Haberal A, Gürakan B, Ozbek N. Complete blood count parameters for healthy, small-for-gestational-age, full-term newborns // Clin Lab Haematol. 2006 Apr; 28 (2): 97–104.

Для цитирования. Барановская И.Б., Самохина О.Ф., Бойко Н.В., Сысоева И.П. Особенности гемопоэза у новорожденных с признаками морфофункциональной незрелости // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 15–21.



XN-серия

Уверенность в полученных
результатах

Высококочувствительное обнаружение
лейкозов и лимфом



Современные подходы к лабораторной диагностике микросфероцитарных анемий

Т. Т. Асатрян, аспирантка кафедры биологической и общей химии¹

М. Н. Зенина, врач клинической лабораторной диагностики²

Л. Б. Гайковая, д.м.н., проф., зав. кафедры биологической и общей химии¹

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

²ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, г. Санкт-Петербург

Modern approaches to laboratory diagnostic of microspherocytic anemia

T. T. Asatryan, M. N. Zenina, L. B. Gaikovaya

North-Western State Medical University n.a. I.I. Mechnikov, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology; Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Диагностика наследственного сфероцитоза, как наиболее распространенной формы мембранопатий, улучшается благодаря успехам в области биотехнологии и наличию большого количества современных автоматических анализаторов. Все это приводит к сокращению количества пациентов с недиагностированным наследственным сфероцитозом и снижению случаев развития осложнений. Однако, несмотря на совершенствование различных методов оценки эритроцитов, определенные трудности в диагностике наследственного сфероцитоза сохраняются. В настоящем исследовании представлен разработанный авторами алгоритм лабораторной диагностики микросфероцитарных анемий, что позволит проводить пациентам с высокой вероятностью наследственного сфероцитоза дифференциальную диагностику с другими видами гемолитических анемий.

Ключевые слова: микросфероцитоз, гемолитическая анемия, наследственный сфероцитоз, алгоритм

Summary

Diagnosis of hereditary spherocytosis, as the most common form of membranopathy, is improved, thanks to advances in biotechnology and the presence of a large number of modern automatic analyzers. All this leads to a reduction in the number of patients with undiagnosed hereditary spherocytosis and a decrease in the incidence of complications. However, despite the improvement of various methods of evaluation of red blood cells, some difficulties in the diagnosis of hereditary spherocytosis remain. In this study, the authors developed an algorithm for the laboratory diagnosis of anemias microperimetry that will allow patients with high probability of hereditary spherocytosis differential diagnosis with other types of hemolytic anemia.

Key words: microspherocytosis, hemolytic anemia, hereditary spherocytosis, algorithm

Наследственный сфероцитоз (НС, по МКБ 10: D 58.0) представляет собой наследственное заболевание, связанное с дефектом мембраны эритроцита, сопровождающееся развитием гемолитической анемии (ГА) различной степени тяжести. В северной части Европы НС является самой распространенной причиной наследственной гемолитической анемии. Распространенность среди других национальностей недостаточно изучена [1].

Ни один из существующих лабораторных методов не обладает достаточной чувствительностью и специфичностью для надежной диагностики микросфероцитарных анемий. Для постановки диагноза требуется комбинация различных тестов, которые

дополняют друг друга. По этой причине одним из перспективных направлений в диагностике НС является разработка новых методов оценки дефектов мембраны эритроцитов и создание алгоритма лабораторных исследований НС[2].

Цель исследования

Разработать и обосновать алгоритм лабораторной диагностики наследственного сфероцитоза с использованием современных методов исследования.

Материалы и методы

В исследование были включены 41 пациент (17 мужчин, 24 женщины) в возрасте от 23 лет до 61 года (медиана 26 лет), находившихся на обследо-

вании и лечении в ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА России в период с сентября 2015-го по апрель 2018 года.

По результатам проведенного обследования в основную группу были включены 18 пациентов с НС. Контрольную группу составили 23 пациента с доказанным отсутствием гематологических заболеваний (табл. 1).

Всем пациентам однократно проводили гематологические и биохимические исследования: клинический анализ крови (КАК), включающий основные эритроцитарные параметры: концентрация гемоглобина (Hb), количество эритроцитов (RBC), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (MCH), ширина распределения эритроцитов по объему (RDW), а также интегральные эритроцитарные параметры (Hb/MCHC, Hb/RDW, MCHC/RDW), обязательную микроскопию мазка периферической крови с описанием формы эритроцитов и расчетом морфометри-

Таблица 1
Характеристика групп больных по полу и возрасту

Группы	Пол		Возраст, годы		
	Мужской	Женский	Min-max	Me	
Основная группа (n = 18)	9	9	6	61	24
Контрольная группа (n = 23)	8	15	8	42	27

ческих параметров эритроцитов; определение скорости лизиса эритроцитов с использованием подкисленного глицеринового реактива, тест на определение интенсивности свечения красителя эозин-5-малеимида (ЭМА-тест).

Венозную кровь забирали в пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта K_3 ЭДТА (Vacuette, GreinerBio-One, Австрия) для клинического анализа крови и ЭМА-теста; для определения скорости лизиса эритроцитов — в пробирки с Li-гепарином (Vacuette, GreinerBio-One, Австрия).

КАК выполняли не позднее 6 часов от момента забора крови на гематологическом анализаторе Sysmex KX-21N (Sysmex, Япония). На основании полученных данных оценивали основные эритроцитарные параметры и рассчитывали соотношения Hb/MCHC, Hb/RDW и MCHC/RDW.

Окраску мазков проводили по методу Паппенгеймера.

Для определения морфометрических параметров эритроцитов анализировали изображения окрашенных мазков с помощью аппаратно-программного комплекса (АПК) «ВидеоТест-Морфология», который в автоматическом режиме выделяет, измеряет и распределяет эритроциты на классы по заложенным расчетным эритроцитарным параметрам [3]. Процесс обработки с возможностью коррекции изображения визуально контролировался оператором (врачом клинической лабораторной диагностики) на экране монитора.

Лизис эритроцитов оценивали с помощью *глицеринового теста*. Регистрацию скорости разрушения эритроцитов проводили на автоматическом анализаторе Sapphire 400 (США). Изменение оптической плотности регистрировали в течение 10 мин. при 37 °С (длина волны 625 нм). Скорость лизиса эритроцитов оценивали визуально по форме графика снижения ОП во времени.

Тест на связывание красителя эозин-5-малеимида (ЭМА-тест) основан на определении интенсивности свечения красителя эозин-5-малеимида, который связывается с лизином-430 первой внеклеточной петли белка полосы 3 мембран эритроцитов. ЭМА-тест включает в себя трехкратную отмывку эритроцитов в физиологиче-

ском растворе (центрифугирование при 1 500 об./мин.), инкубацию отмытых эритроцитов с красителем эозин-5-малеимидом в течение 60 мин., двухкратную отмывку от несвязавшегося красителя физиологическим раствором. После проявления окраски с использованием PBS с pH = 7,0 проводили определение средней интенсивности флюоресценции (СИФ) на проточном цитометре FC 500 (Beckman Coulter, США) с использованием программы CXAnalysis по данным 50 000 эритроцитов, гейтированных по параметрам светорассеяния.

В каждой аналитической серии СИФ пациента с подозрением на наличие НС сопоставляли с СИФ трех пациентов с отсутствием гематологических заболеваний при условии, что забор крови всех пациентов производился в один день, пробы хранились в одинаковых условиях, анализ выполнялся одномоментно.

В связи с нестабильностью красителя эозин-5-малеимид в разведенном состоянии и отсутствием контрольных материалов, результат представляли как отношение СИФ пациента к сумме СИФ здоровых лиц в одной аналитической группе, выраженный в процентах:

$$\text{СИФ \%} = \frac{\text{СИФ}_{\text{пациента}}}{\sum \text{СИФ}_{\text{доноров}}} \times 100\%.$$

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Statistica for Windows 6.0 с использованием параметрических и непараметрических критериев. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При сравнении эритроцитарных показателей у пациентов основной и контрольной групп достоверных различий между основными эритроцитарными параметрами не выявили, за исключением параметра RDW, который указывает на гетерогенность размеров эритроцитов (степень анизоцитоза), но не является специфическим признаком НС (табл. 3).

В последнее время ряд исследователей предлагают использовать расчетные параметры Hb/MCHC, Hb/RDW и MCHC/RDW для лабораторной диагностики микросфероцитарных анемий [4]. При расчете этих отношений в контрольной и основной группе были получены следующие значения (табл. 4).

У пациентов с врожденной микросфероцитарной анемией значения отношений Hb/MCHC, Hb/RDW

Таблица 3
Эритроцитарные показатели у больных с врожденной микросфероцитарной анемией, полученные с использованием анализатора Sysmex KX-21N

Параметр	Контрольная группа	Основная группа (НС)	Значения p
Hb, г/л	137,6 ± 9,3	118,8 ± 32,8	0,07
Hct, л/л	0,40 ± 0,02	0,4 ± 0,1	0,06
RBC, ×10 ¹² /л	4,7 ± 0,2	4,3 ± 0,9	0,09
MCH, пг	28,6 ± 1,3	27,6 ± 2,2	0,05
MCHC, г/л	34,7 ± 0,9	36,7 ± 1,0	0,62
MCV, фл	83,1 ± 1,7	81,7 ± 14,6	0,71
RDW, %	13,6 ± 0,5	17,6 ± 3,9	0,0001

Таблица 4
Отношения $Hb/MCHC$, Hb/RDW и $MCHC/RDW$ у больных с врожденной микросфероцитарной анемией

Параметр	Контрольная группа	Основная группа (НС)	Значения р
$Hb/MCHC$	0,377 (0,359; 0,399)	0,374 (0,319; 0,408)	0,050
Hb/RDW	10,328 (9,500; 10,855)	7,837 (7,073; 9,658)	0,001
$MCHC/RDW$	27,407 (25,603; 28,046)	22,546 (18,431; 26,357)	0,001

Таблица 5
Значения эритроцитарных показателей, полученных с помощью аппаратно-программного комплекса «ВидеоТест-Морфология»

Исследуемые параметры	Контрольная группа	Основная группа (НС)	Значения р
Толщина эритроцитов микроцитов ($T_{мэр}$), мкм	$2,3 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,2$	0,001
Толщина эритроцитов ($T_{эр}$)	$2,1 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,3$	0,005
Индекс сферичности эритроцитов микроцитов ($R_{мэр}$)	$2,8 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	0,003
Индекс сферичности эритроцитов ($R_{эр}$)	$3,7 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,1$	0,005
Средний диаметр эритроцитов ($D_{эр}$)	$7,5 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,2$	0,005
Содержание микроцитов (% микр.)	$12,6 \pm 6,7$	$68,7 \pm 16,9$	0,005
Содержание нормоцитов (% норм.)	$72,9 \pm 7,3$	$30,4 \pm 16,5$	0,005
Содержание макроцитов (% макр.)	$14,5 \pm 11,8$	$1,9 \pm 1,2$	0,005

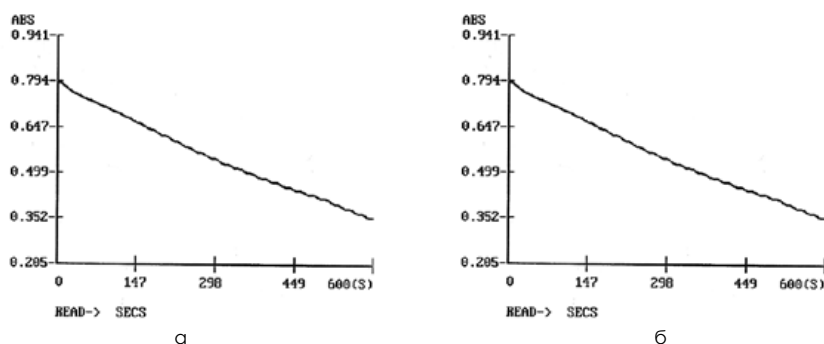


Рисунок 1. Графическое представление скорости лизиса эритроцитов в группах: а — контрольная (здоровые лица); б — основная (с диагнозом «наследственный сфероцитоз»).

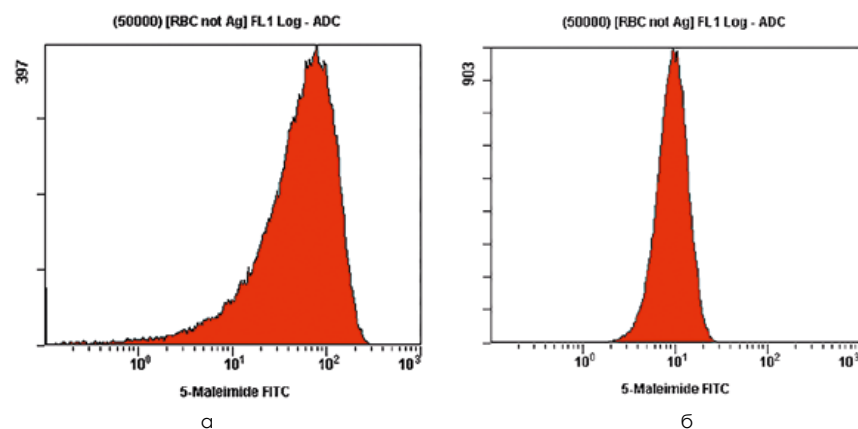


Рисунок 2. Гистограмма интенсивности флуоресценции эозин-5-малеимида эритроцитов в группах: а — контрольная; б — основная.

и $MCHC/RDW$ были достоверно ниже, чем в контрольной группе, что свидетельствует о возможности использования этих параметров для подозрения на наличие микросфероцитоза и направления пациента для более детального обследования.

При анализе изображений мазков крови с применением АПК были установлены морфометрические параметры эритроцитов при НС (табл. 5).

Как следует из представленных в табл. 5 данных, использование эритроцитарных показателей, полу-

ченных с помощью АПК, позволило выявить достоверные различия в группах по всем изученным параметрам. Среди них наиболее значимыми для дифференциальной диагностики микросфероцитарной анемии были толщина эритроцитов ($T_{эр}$), индекс сферичности эритроцитов ($R_{эр}$) и средний диаметр эритроцитов ($D_{эр}$).

При проведении глицеринового теста в контрольной группе и у пациентов с НС графики регистрации скорости лизиса эритроцитов контрольной группы (рис. 1 а) имели линейный вид (ОП равномерно уменьшалась со временем), в основной группе (рис. 1 б) — в виде кривой, отражающей замедляющееся неравномерное снижение ОП.

Изучение кинетики гемолиза эритроцитов у пациентов основной группы показало наличие двух фаз: начальный период у всех пациентов составлял от 50 до 100 с, снижение ОП происходило быстрее, чем во второй фазе. У пациентов основной группы лизис эритроцитов протекает быстрее по сравнению с контрольной группой, что, возможно, обусловлено наличием популяции микросфероцитов.

При исследовании интенсивности экспрессии эозин-5-малеимида результаты были представлены в виде гистограмм (рис. 2 а, б), которые отображают среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) (табл. 6).

У пациентов основной группы установлено достоверное снижение средней интенсивности флуоресценции по сравнению с контрольной группой.

Обоснование диагностического алгоритма. Полученные данные легли в основу лабораторного алгоритма диагностики различных форм гемолитических анемий, который предполагает три этапа (рис. 4).

Первый этап: клинический анализ крови, в результате которого на основании основных эритроцитарных и двух расчетных индексов ($Hb/MCHC$ и Hb/RDW), а также наличия микросфероцитов в окрашенных мазках крови можно выделить группу пациентов, требующих дальнейшее проведение дифференциального диагноза.

На втором этапе проводятся морфометрия эритроцитов в окрашенных мазках периферической крови с ис-

пользованием АПК и глицериновый тест на определение скорости лизиса эритроцитов.

Третий этап — это подтверждение наследственного сфероцитоза с помощью теста на связывание красителя эозин-5-малеимида.

Таким образом, предложенная схема позволит выявить латентные формы НС и провести дифференциальный диагноз гемолитических анемий, протекающих с появлением микросфероцитов в крови.

По нашему мнению, предложенный лабораторный алгоритм выявления пациентов с НС может быть встроен в сложившуюся систему оказания лабораторных услуг в крупных межрайонных централизованных клинко-диагностических лабораториях (МЦКДЛ). Он не требует больших дополнительных финансовых вложений, поскольку эритроцитарные параметры и рассчитываемые на их основе индексы (Hb/MCHC и Hb/RDW) основываются на результатах рутинного клинического анализа крови, проводимого на современных гематологических анализаторах. При этом алгоритм позволит провести как скрининг наиболее распространенного типа гемолитической анемии, так и подтверждение диагноза наследственного сфероцитоза при наличии проточного цитометра для теста на связывание красителя эозин-5-малеимида. Внедрение данного алгоритма в лабораторную практику медицинских организаций позволит проводить направленный поиск носителей НС и обеспечить создание реестра таких пациентов. Своевременная диагностика НС позволит снизить риск ошибок при дифференциальной диагностике различных видов гемолитических анемий и необоснованной лекарственной терапии. Кроме того, своевременная постановка диагноза НС освободит пациента и медицинскую организацию от ненужных дополнительных обследований.

Таким образом, разработанный лабораторный алгоритм диагностики позволит с высокой вероятностью наследственного сфероцитоза провести дифференциальную диагностику у пациентов с другими видами

Таблица 6
Значения средней интенсивности флуоресценции в контрольной и основной группах

	Контрольная группа	Основная группа (НС)	Значение p
СИФ, %	100 (97,326; 102,907)	74,675 (65,262; 83,116)	0,017

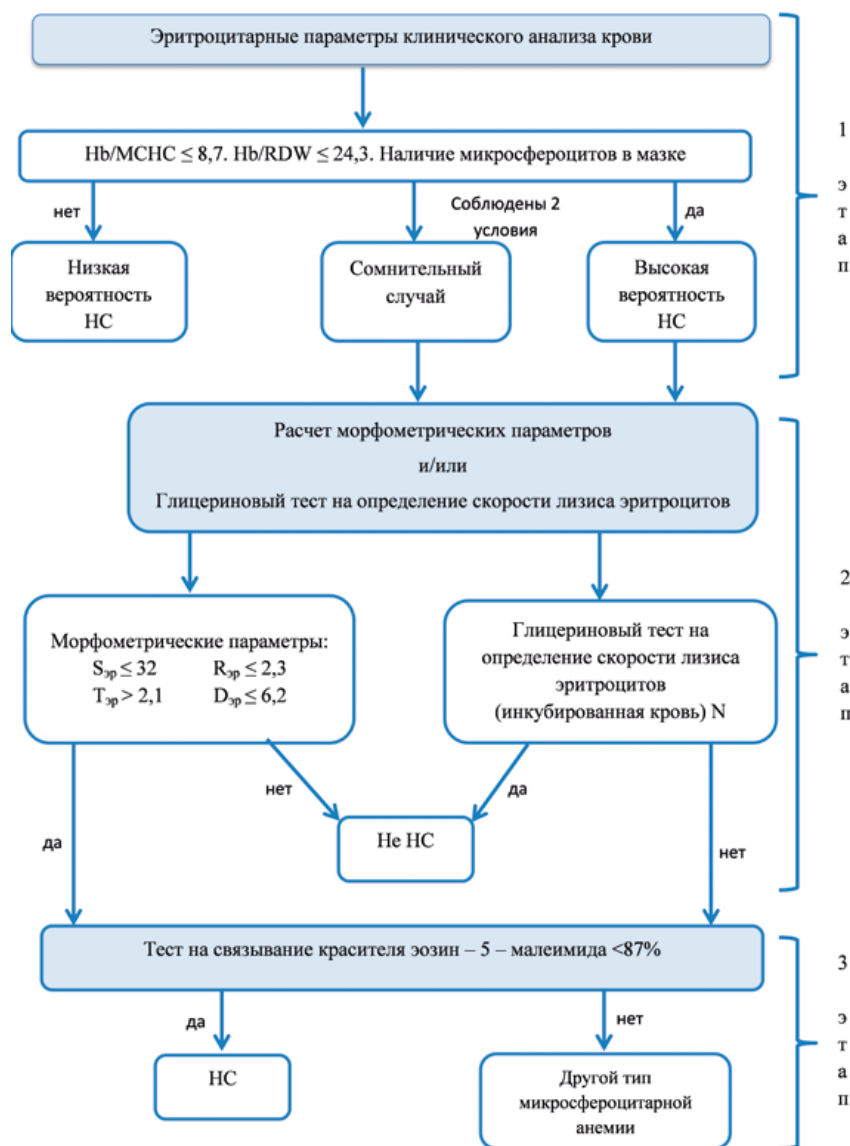


Рисунок 3. Лабораторный алгоритм диагностики наследственного сфероцитоза.

гемолитических анемий и установить наличие наследственного сфероцитоза, своевременно назначить соответствующую терапию, тем самым решить важную социально-значимую задачу по улучшению качества медицинской помощи данной категории пациентов.

Список литературы

1. Barcellini, Wilma & Bianchi, Paola & Fermo, Elisa & G Imperiali, Francesca & P Marcella, Anna & Vercellati, Cristina & Zaninoni, Anna

- & Zanella, Alberto (2011). Hereditary red cell membrane defects: Diagnostic and clinical aspects. *Blood transfusion — Trasfusione del sangue*. 9. 274–7. DOI: 10.2450/2011.0086–10.
2. Perrotta SI, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet*. 2008 Oct 18; 372 (9647): 1411–26. DOI: 10.1016/S0140-6736 (08) 61588–3.
3. Зенина М.Н., Бессмельцев С.С., Козлов А.В., Черныш Н.Ю. Морфометрические показатели эритроцитов // medline.ru. — 2015. — Т. 16.
4. Rocha S, Costa E, Rocha-Pereira P, et al. Complementary markers for the clinical severity classification of hereditary spherocytosis in unsplenectomized patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2011; 46: 166–70. DOI: 10.1016/j.bcmd.2010.11.001.

Для цитирования. Асатрян Т.Т., Зенина М.Н., Гайковская Л.Б. Современные подходы к лабораторной диагностике микросфероцитарных анемий // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 22–25.

Оценка эффективности Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных сахарным диабетом первого типа

А. В. Луговая, к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики отделения лабораторной диагностики клиники¹

Н. М. Калинина, д.м.н., проф. кафедры иммунологии¹, гл. научный сотрудник, врач – аллерголог-иммунолог²

В. Ф. Митрейкин, д.м.н., проф. кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии¹

Ю. В. Эмануэль, к.м.н. доцент кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного обучения¹

Ю. П. Ковальчук, к.м.н. зам. гл. врача клиники по лабораторной диагностике¹

А. В. Артемова, врач-невролог, ассистент кафедры неврологии и мануальной медицины факультета последипломного обучения¹

В. С. Эмануэль, член студенческого научного общества¹

Ю. В. Мусихина, медицинская сестра³

В. Л. Эмануэль, д.м.н., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины¹

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

²ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А. М. Никифорова» МЧС России, г. Санкт-Петербург

³СПбГБУЗ «Городская станция скорой медицинской помощи», г. Санкт-Петербург

Evaluation of efficiency of Fas-mediated apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with type 1 diabetes mellitus

A. V. Lugovaya, N. M. Kalinina, V. F. Mitreikin, Yu. V. Emanuel, Yu. P. Kovaltchuk, A. V. Artyomova, V. L. Emanuel, Yu. V. Musikhina, V. L. Emanuel

First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, All-Russian Centre for Emergency and Radiation Medicine n.a.

A. M. Nikiforov, City Emergency Station; Saint Petersburg, Russia

Резюме

Известно, что система Fas/FasL играет центральную роль в поддержании периферической ауто толерантности и тканевого гомеостаза организма [12, 18]. Fas-опосредованный апоптоз индуцируется при связывании Fas(CD 95/APO-1/TNFRSF6)-рецептора с Fas(CD 95L/CD 178/TNFSF6)-лигандом на соответствующих клетках [24]. Триггерование экспрессии поверхностных клеточных Fas-рецепторов (Fas) регулирует элиминацию аутореактивных Т- и В-лимфоцитов путем апоптоза. Известно, что нарушение активации Fas-опосредованного апоптоза в отдельных субпопуляциях Т-клеток играет важную роль в патогенезе сахарного диабета первого типа (СД-1). Ключевым моментом в инициации СД-1 является устойчивость к апоптозу активированных аутореактивных Т-лимфоцитов, которые мигрируют из кровяного русла в поджелудочную железу и принимают активное участие в деструкции β-клеток. К настоящему моменту большинство результатов по изучению Fas-опосредованного апоптоза при СД-1 получено в экспериментах *in vitro* [11, 18, 31]. Не вызывает сомнений тот факт, что аутоиммунные изменения *in vivo* носят более глубокий характер, и экстраполяция эффектов, выявленных в системе *in vitro*, на организм не всегда правомерна. В связи с этим представляется актуальной оценка эффективности Fas-опосредованного апоптоза Т-лимфоцитов в крови больных СД-1 в зависимости от фазы компенсации и длительности течения заболевания. В статье изучены маркеры Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов периферической крови больных СД-1 и лиц с высоким риском развития СД-1. Проведена оценка поверхностной экспрессии Fas в отдельных субпопуляциях Т-лимфоцитов. Установлено, что у больных в фазе декомпенсации СД-1 происходит ингибирование Fas-опосредованного апоптоза аутореактивных CD95⁺-клеток при участии растворимой формы Fas (sFas — soluble Fas). При компенсации углеводного обмена наблюдается реализация апоптоза лимфоцитов по Fas-пути с помощью растворимого Fas-лиганда (sFasL — soluble FasL). В фазе компенсации СД-1 и у лиц группы риска выявлено увеличение содержания sFasL. Вероятно, это имеет протективное значение, поскольку sFasL принимает участие в удалении аутореактивных CD95⁺-клеток в периферической крови.

Ключевые слова: апоптоз, рецепторы смерти, Fas-рецептор, Fas-лиганд, Т-лимфоциты, сахарный диабет I типа, β-клетки.

Summary

The Fas/FasL system is known to play a central role in maintaining peripheral self-tolerance and tissue homeostasis of the organism [12, 18]. Fas-mediated apoptosis is induced by binding of the Fas(CD 95/APO-1/TNFRSF6)-receptor to the Fas(CD 95L/CD 178/TNFSF6)-ligand on the respective cells [24]. Triggering of the expression of cell surface Fas receptors (Fas) regulates the elimination of autoreactive T- and B-lymphocytes by apoptosis. It is known that impaired activation of Fas-mediated apoptosis in individual subpopulations of T-cells plays an important role in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus (T1DM). The main key point in the development of T1DM is resistance to apoptosis of activated autoreactive T-lymphocytes, which migrate from the bloodstream to the pancreas and take an active part in β-cells destruction. At the present time, most of the results on the study of Fas-mediated apoptosis in T1DM were obtained in experiments *in vitro* [11, 18, 31]. There is no doubt that *in vivo* autoimmune pathological changes are more profound, and extrapolation of the results obtained in the experiment to the organism is not always valid. Thereby, it seems relevant to evaluate the efficiency of Fas-mediated apoptosis of T-lymphocytes in the blood of patients with T1DM, depending on the compensation phase and the duration of the disease. In the article, the markers of Fas-mediated apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with type 1 diabetes mellitus and individuals with high risk of T1DM development have been studied. The surface expression of Fas in individual subpopulations of T-lymphocytes was evaluated. The inhibition of Fas-mediated apoptosis of autoreactive CD95⁺-cells by soluble Fas-receptor was detected in patients with decompensation of T1DM. In compensation phase of T1DM Fas-mediated apoptosis of lymphocyte was successfully realized via the soluble Fas ligand (sFasL). The increased level of soluble FasL was revealed in compensation phase of T1DM and in individuals with high risk of T1DM development. This probably has a protective value, since the soluble FasL is involved in the removal of the peripheral blood autoreactive CD95⁺-cells.

Key words: apoptosis, death receptors, Fas-receptor, Fas-ligand, T lymphocytes, type 1 diabetes mellitus, β-cells.

Введение

Fas-опосредованный апоптоз представляет собой инициаторную фазу трансдукции апоптотического сигнала и относится к внешнему (рецепторному) пути запуска гибели клетки.

В зависимости от механизма запуска апоптотического каскада выделяют два основных сигнальных пути, ведущих к индукции апоптоза клеток млекопитающих: внешний (рецепторный) и внутренний (митохондриальный или Bcl-2-регулируемый) [6, 14, 18, 25]. Внешний путь опосредуется рецепторами клеточной смерти DR (Death Receptor), к числу которых относится Fas-рецептор (Fas). Fas содержит в цитоплазматической части домен смерти DD (Death Domain) — центральный физиологический регулятор апоптоза [6, 18, 26]. Связывание Fas с Fas-лигандом (FasL) активирует Fas-ассоциированный адаптерный белок домена смерти FADD (Fas-Associated Death Domain protein), что приводит к образованию эффекторного комплекса DISC (Death Initiating Signaling Complex) — сигнального комплекса, инициирующего смерть [13, 14, 25]. DISC активирует прокаспазу-8, которая подвергается аутокаталитическому расщеплению и переходит в активную форму. Таким образом, взаимодействие Fas с FasL приводит к образованию активной каспазы-8, относящейся к группе иницирующих каспаз [26, 29].

Fas(CD 95/APO-1/TNFRSF6)-антиген представляет собой мембранный белок, который является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF-Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family) и относится к группе рецепторов смерти DR (Death Receptor) [24]. Новейшие литературные источники сообщают, что в норме Fas повсеместно экспрессируется в тканях человека на базальном уровне, и порог его активации должен строго регулироваться, чтобы избежать чрезмерной гибели клеток [12, 24]. Недавно были выявлены негативные регуляторы FasR, основным из которых является белок FLIP (Flice-Like Inhibitory Protein) — Flice-подобный ингибирующий белок, представля-

ющий собой ингибитор каспазы-8/FLICE. Изменение в клетке баланса между каспазой-8 и ее регулятором FLIP может переключать Fas-опосредованную передачу сигналов с апоптоза на пролиферацию и наоборот [24, 26, 29]. Существует функционально активная растворимая форма Fas, которая является результатом протеолитического расщепления мембраносвязанных рецепторов или образуется при альтернативном сплайсинге [9].

Fas/APO-1-лиганд (FasL/CD 178/TNFSF6) представляет собой мембранный белок и является членом суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли (TNF-Tumor Necrosis Factor), которые относятся к цитокинам [6, 24]. Подобно TNF-лиганду, FasL может освобождаться с клеточной поверхности и быть физиологически активным в растворимой форме [9, 21, 22].

Fas-опосредованный апоптоз обеспечивает элиминацию нежелательных для организма клеток иммунной системы, а также участвует в регуляторном подавлении иммунных реакций и цитотоксичности Т-лимфоцитов [18]. Если в системе Fas/FasL имеется дефект, активированные лимфоциты могут накапливаться, что приводит к развитию аутоиммунного лимфопролиферативного синдрома (АЛПС) — группы заболеваний, характеризующихся генетическими дефектами генов Fas и FasL, аутоиммунными нарушениями и повышенной склонностью к развитию злокачественных лимфоидных образований [23]. В основе патогенеза АЛПС лежит генетически детерминированное нарушение Fas-опосредованного апоптоза активированных Т-клеток, приводящее к появлению в периферической крови двойных негативных Т-лимфоцитов (CD 3⁺ CD 4⁻ CD 8⁻) [6].

В современной литературе широко обсуждается роль рецепторов смерти в деструкции β-клеток при сахарном диабете первого типа (СД-1) [18, 26, 30]. В исследованиях с использованием изолированных островков поджелудочной железы человека показано, что воздействие стрессовых факторов (гипергликемия,

избыточное количество свободных радикалов, активные формы кислорода, продукция IL-1β клетками микроокружения) усиливает экспрессию Fas на β-клетках, что приводит к их гибели по механизму Fas-опосредованного апоптоза [18]. Имунокомпетентные клетки, инфильтрирующие островковую ткань поджелудочной железы, продуцируют провоспалительные цитокины: интерлейкин 1b (IL-1b), фактор некроза опухоли α (TNF-α) и интерферон γ (IFN-γ), известные своими проапоптогенными свойствами [16, 19, 20]. IL-1β индуцирует усиление экспрессии Fas на β-клетках, что повышает их готовность к Fas-опосредованному апоптозу, который реализуется аутореактивными Т-клетками, экспрессирующими FasL. Активированные цитотоксические Т-лимфоциты (CD 8⁺ ЦТЛ), входящие в состав воспалительных инфильтратов поджелудочной железы (инсулитов), также могут разрушать β-клетки рецепторным Fas-зависимым способом [10, 18, 30].

Ранее мы сообщали о повышенной экспрессии Fas, выявленной нами в отдельных субпопуляциях Т-лимфоцитов периферической крови больных СД-1 [3]. Однако нельзя не учитывать патогенетическое значение растворимых форм Fas и FasL в развитии аутоиммунитета при СД-1, поскольку диагностическое и прогностическое значение этих показателей Fas-опосредованного апоптоза активно изучается при системных и органоспецифических аутоиммунных заболеваниях, при сепсисе, острой почечной недостаточности, онкологических заболеваниях [9, 21, 22, 28]. Комплексная оценка эффективности Fas-опосредованного апоптоза с определением всех маркеров, принимающих участие в данном варианте рецепторного пути запуска апоптотической программы, может дать более точное представление о механизмах и значении дисрегуляции системы Fas/FasL в патогенезе СД-1.

По оценкам экспертов ВОЗ, в течение следующих нескольких десятилетий СД-1 достигнет масштабов пандемии [32]. Поэтому особое зна-

чение приобретает ранняя диагностика и профилактика заболевания у лиц с высоким риском развития СД-1. В связи с этим представляется актуальной оценка маркеров Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов не только у больных СД-1, но и у лиц с высоким риском развития аутоиммунного диабета.

Цель исследования: изучить особенности Fas-опосредованного апоптоза мононуклеаров периферической крови больных СД-1 в зависимости от фазы компенсации и длительности течения заболевания, а также у лиц с высоким риском развития СД-1.

Материалы и методы

Характеристика обследуемых групп больных. Было обследовано 63 больных с достоверно установленным диагнозом СД-1 и 15 человек с высоким риском развития СД-1. Контрольную группу (I группа) составили 30 здоровых лиц, по полу и возрасту сопоставимых с больными СД-1. Распределение пациентов по группам проводилось в зависимости от фазы компенсации и длительности течения заболевания. II группу (декомпенсированный СД-1) составили 17 больных с впервые выявленным СД-1 (группа IIa) и 19 пациентов (группа IIб) с длительностью течения СД-1 в среднем $15,3 \pm 5,1$ года. В III группу (состояние компенсации СД-1) были включены

13 больных с длительностью заболевания до 1 года (группа IIIa) и 14 человек с продолжительностью СД-1 в среднем $15,1 \pm 5,4$ года (группа IIIб). IV группу составили 15 человек с высоким риском развития СД-1, которые являлись близкими родственниками обследованных больных СД-1. В группу риска были отобраны лица с повышенным титром (более 1/20) аутоантител к цитоплазматическим антигенам островковых клеток — ICA (Islet Cell Autoantibodies) в сыворотке и нарушением толерантности к глюкозе. ICA могут служить предиктором заболевания у родственников больных СД-1, так как они появляются в крови за 1–8 лет до клинической манифестации сахарного диабета [7, 30].

Иммунофенотипирование мононуклеаров периферической крови осуществляли методом проточной цитометрии с использованием следующих моноклональных антител Immunotech (Coulter Corporation, США): anti-CD 3, конъюгированные с FITC (Fluorescein Isothiocyanate); anti-CD 4-FITC; anti-CD 8-FITC; anti-CD 16-FITC; anti-CD 20-FITC; anti-CD 25-FITC; anti-HLA-DR-FITC; anti-CD 95-FITC и их изотипических контролей.

Для оценки апоптотических процессов в отдельных субпопуляциях Т-лимфоцитов определяли уровень

поверхностной экспрессии Fas-рецептора с использованием двойной флуоресцентной метки FITC (Fluorescein Isothiocyanate) и PE (Phycoerythrin). Исследование проводили с применением следующих сочетаний антител: anti-CD 3-FITC/anti-CD 95-PE, anti-CD 4-FITC/anti-CD 95-PE и anti-CD 8-FITC/anti-CD 95-PE. Цитометрический анализ лимфоцитов проводили на проточном цитометре EPICS XL (Coulter Corporation, США).

Определение растворимых форм Fas-рецептора (sFas) и Fas-лиганда (sFasL) в сыворотке крови проводили методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем Human sFas Ligand ELISA фирмы Bender MedSystems (Австрия) и Human Fas ELISA фирмы BD Biosciences (США).

Для статистической обработки полученных данных использовали непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни для сравнения средних. Обработка материала проведена с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft, США). Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии значимых различий) принимали равным 0,05.

Результаты исследования

Иммунофенотипирование мононуклеаров периферической крови показало достоверное повышение относительного и абсолютного количества CD 95⁺-лимфоцитов во всех группах больных СД-1 по сравнению с группой контроля (I группа), что свидетельствует о повышенной готовности иммунокомпетентных клеток к апоптозу при СД-1 (табл. 1). Максимальное увеличение относительного и абсолютного содержания CD 95⁺-клеток и количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор (Fas), было выявлено при декомпенсации СД-1 независимо от продолжительности заболевания (группы IIa и IIб). Полученные данные указывают на то, что при СД-1 повышение готовности иммуноком-

Таблица 1
Содержание CD 95⁺-клеток и Т-лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор, в периферической крови больных СД-1 и лиц группы риска

Группы	CD 95 ⁺		CD 3 ⁺ CD 95 ⁺	CD 3 ⁺ CD 95 ⁺	CD 8 ⁺ CD 95 ⁺
	Относительное содержание, %	Абсолютное содержание, мм ³	Относительное содержание, %		
I	4,2	80	3,0	2,3	0,9
IIa	12,4**	260**	10,8**	7,3**	6,0***
IIб	13,2**	222**	11,1**	8,1**	6,7***
IIIa	8,6*	212*	7,3*	5,1*	3,9**
IIIб	8,2*	152*	6,9*	4,8*	3,7**
IV	4,9	90	3,5	3,0	2,1*

Примечание: * — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,05$); ** — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,01$); *** — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,001$).

петентных клеток к апоптозу не зависит от длительности заболевания, а четко ассоциировано с декомпенсацией углеводного обмена и уровнем гликемии.

Среди субпопуляций Т-лимфоцитов следует отметить значительное увеличение процента $CD8^+CD95^+$ -клеток от общего количества цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+CTL$) во всех группах обследуемых пациентов по сравнению с группой контроля (см. рис). Повышение относительного содержания $CD8^+CTL$, экспрессирующих Fas, максимально выражено при декомпенсации заболевания (группы IIa и IIб). Увеличение количества клеток с фенотипом $CD8^+CD95^+$ при СД-1, вероятно, является компенсаторным механизмом, направленным на элиминацию аутореактивных цитотоксических Т-лимфоцитов путем Fas-опосредованного апоптоза. Согласно данным литературы, именно эффекторные цитотоксические Т-лимфоциты играют доминирующую роль в деструкции β -клеток поджелудочной железы [18, 30].

В то же время достоверное повышение количества клеток с фенотипом $CD8^+CD95^+$ в крови у лиц с высоким риском развития СД-1 (IV группа) по сравнению с группой контроля (I группа) является неблагоприятным прогностическим фактором. Эти данные указывают на то, что уже в латентной стадии СД-1 происходит экспансия аутореактивных клонов цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови с последующей их миграцией в орган-мишень (поджелудочную железу), что приводит к прогрессированию аутоиммунного процесса [28, 30].

Исследованием установлено, что содержание растворимых форм Fas (sFas — soluble Fas) и FasL (sFasL — soluble FasL) в сыворотке крови больных СД-1 не зависело от продолжительности заболевания, а изменялось в зависимости от состояния компенсации углеводного обмена (табл. 2). У больных СД-1 в фазе декомпенсации заболевания (II группа) наблюдалось достоверное увеличение содержания sFas по сравнению с группой контроля

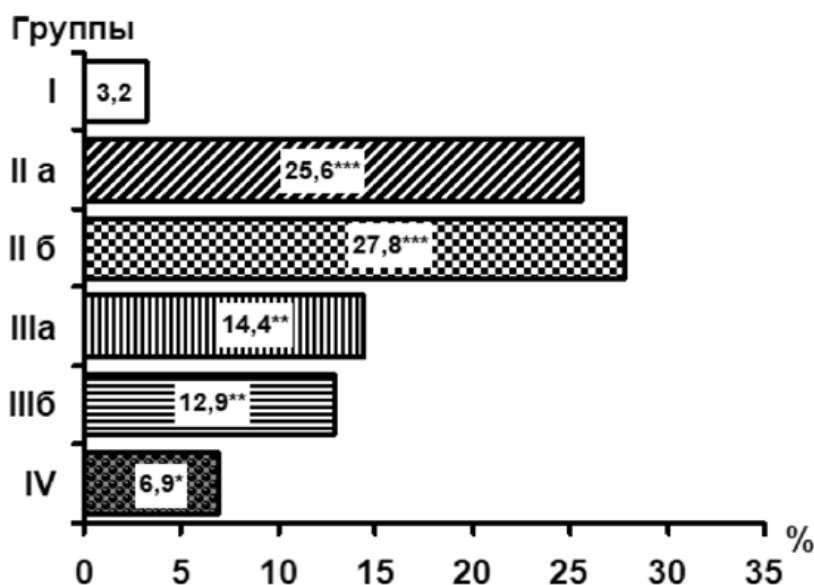


Рисунок. Процент $CD8^+CD95^+$ -клеток от общего числа цитотоксических Т-лимфоцитов.

Примечание: * — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,05$); ** — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,01$); *** — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,001$).

Таблица 2
Содержание растворимой формы Fas-рецептора и Fas-лиганда в сыворотке крови больных СД-1 и лиц группы риска

Показатель	Контрольная группа, n = 8	Больные СД-1		Группа риска СД-1, n = 14
		Фаза декомпенсации заболевания, n = 26	Фаза компенсации заболевания, n = 24	
	I	II	III	IV
sFas (нг/мл)	778	1501*	789	864
sFasL (нг/мл)	0,102	0,118	0,243*	0,403**

Примечания: * — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,05$); ** — различия по изучаемому показателю с контрольной группой (I) достоверны ($p < 0,01$).

(I группа) и остальными обследуемыми группами пациентов. Полученные результаты согласуются с данными литературы о взаимосвязи между повышением концентрации sFas в сыворотке больных и ухудшением течения заболевания [9, 21, 22]. Сообщалось, что высокий уровень сывороточного sFas коррелирует с тяжестью септического процесса [9]. Показано, что содержание sFas в крови увеличивалось по мере нарастания почечной дисфункции у больных с острым повреждением почек [9, 21]. Согласно данным литературы, растворимая форма Fas конкурирует с мембранным Fas-рецептором за связывание лиганда, чем препятствует «физиологическому» апоптозу клеток, подлежащих элиминации. При увеличении в цирку-

ляции содержания sFas не все дефектные клетки могут реализовать свою апоптотическую программу. В результате происходит их аккумуляция в периферической крови, что приводит к усугублению патологического процесса [6, 23].

Содержание sFasL при компенсации СД-1 было достоверно выше, чем в группе декомпенсации, и достоверно ниже, чем в группе риска (табл. 2). Следует отметить значительное увеличение содержания sFasL в группе риска, что согласуется с данными литературы [28]. По мнению авторов, повышение sFasL в латентной стадии СД-1 имеет протективное значение и направлено на элиминацию аутоагрессивных клонов лимфоцитов путем Fas-опосредованного апоптоза.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженной дисрегуляции в системе Fas/FasL, которая наблюдается на всех этапах развития СД-1.

Обсуждение результатов

Нарушения функционирования Fas-рецептора (Fas) и Fas-лиганда (FasL), как ключевых индукторов рецепторно-зависимого апоптоза, активно изучаются в патогенезе заболеваний, связанных как с ингибированием, так и усилением апоптоза клеток шоковых органов [2, 6]. Недавно было установлено, что Fas-опосредованная активация каспазы-8 играет важную роль в регуляции патогенетических механизмов при бактериальных инфекциях [29]. Выраженное усиление экспрессии мембранных форм Fas и FasL на лимфоцитах периферической крови выявлено у больных с ишемической болезнью сердца, с острым нарушением мозгового кровообращения, у пациентов с вирусными и бактериальными инфекциями, при сепсисе, при вирусе иммунодефицита человека [5, 9, 26, 29]. Показано, что к ранним маркерам прогрессирования сердечной недостаточности относится увеличение в крови растворимой формы FasL [5]. В наших предыдущих исследованиях мы показали значительное увеличение содержания CD95⁺-моноклеаров в крови больных острым коронарным синдромом (ОКС) [4]. Нами было установлено, что окисленные липопротеины низкой плотности индуцируют Fas-опосредованный апоптоз как моноклеаров периферической крови, так и эндотелиоцитов коронарных сосудов, что свидетельствует о системном характере апоптоза при ОКС [1, 4].

В патогенезе сахарного диабета I типа (СД-1) нарушения Fas-опосредованного апоптоза имеют бивалентную природу. Так, если в отношении β-клеток развитие апоптоза сопряжено с прогрессированием заболевания, то, с точки зрения элиминации активированных аутореактивных лимфоцитов, апоптоз желателен и может замедлить деструкцию β-клеток поджелудочной железы.

Двойственная роль рецепторного (внешнего) пути запуска апоптоза в патогенезе СД-1 обусловлена экспрессией опосредующих его молекул (Fas и FasL) как клетками-эффекторами (аутореактивные Т-клетки), так и клетками-мишенями (β-клетки поджелудочной железы) [18]. Выявление взаимосвязей между особенностями Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов периферической крови и состоянием компенсации углеводного обмена, длительностью аутоиммунной деструкции инсулярного аппарата поджелудочной железы у больных СД-1 может способствовать более глубокому пониманию патогенеза заболевания, что и определило цель настоящего исследования. Для оценки роли нарушений апоптоза моноклеаров периферической крови в прогрессировании аутоиммунного процесса на доклинической стадии диабета была обследована группа лиц с высоким риском развития СД-1.

Исследованием установлено, что при СД-1 отмечается повышенная готовность иммунокомпетентных клеток к апоптозу, о чем свидетельствует достоверное повышение количества CD95⁺-клеток во всех обследуемых группах больных СД-1 по сравнению с группой контроля. Максимальное увеличение относительного и абсолютного содержания CD95⁺-клеток и Т-лимфоцитов, экспрессирующих Fas-рецептор, было выявлено при декомпенсации СД-1 независимо от продолжительности заболевания. Это объясняется влиянием гипергликемии, которая повышает чувствительность лимфоцитов периферической крови к Fas-опосредованному апоптозу за счет усиления экспрессии Fas-рецептора на их поверхности, а также индуцирует р53-опосредованный апоптоз клеток-мишеней при участии эффекторной каспазы-3 [8, 11, 17, 27].

Во всех группах обследуемых пациентов наблюдалось увеличение процента CD8⁺CD95⁺-клеток от общего количества цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с группой контроля, более выраженное при декомпенсации заболевания. Это

указывает на стремление иммунной системы ограничить активность аутореактивных цитотоксических Т-лимфоцитов, играющих ведущую роль в деструкции инсулярного аппарата поджелудочной железы.

Для эффективной элиминации CD95⁺-клеток в периферической крови необходимо поддержание баланса между клетками, экспрессирующими Fas и FasL. Важно учитывать возможную роль растворимого Fas-рецептора (sFas) в ингибировании апоптоза, реализуемого по Fas-пути [9].

Полученные нами результаты о повышении sFas при декомпенсации СД-1 находятся в соответствии с результатами ряда авторов, сообщавших об увеличении содержания растворимой формы Fas при некоторых системных и органоспецифических аутоиммунных заболеваниях [9, 21, 22]. Наблюдаемое в нашем исследовании выраженное повышение sFas на фоне резкого увеличения количества CD95⁺-клеток в крови больных СД-1 в состоянии декомпенсации углеводного обмена свидетельствует о неэффективности Fas-опосредованного апоптоза вследствие ингибирования элиминации CD95⁺-клеток по Fas-пути.

Показано, что в удалении аутореактивных клеток человека участвуют как мембранная, так и растворимая формы Fas-лиганда (sFasL) [9, 24]. В эксперименте предварительное культивирование диабетогенных клонов Т-лимфоцитов с sFasL полностью ингибировало развитие аутоиммунного диабета у мышей, которым затем трансплантировали диабетогенные Т-клетки [18]. Это означает, что повышение sFasL при СД-1 имеет протективное значение и направлено на установление периферической толерантности, необходимой для защиты от аутоиммунной агрессии против β-клеток. Сообщалось о повышении sFasL у лиц с высоким риском развития СД-1 на фоне снижения в крови количества аутореактивных CD4⁺CD95⁺- и CD8⁺CD95⁺-лимфоцитов, в связи с чем авторы предполагают участие sFasL в удалении патогенных Т-клеток на доклинической стадии заболевания [28].

Следовательно, выявленное нами повышение sFasL у больных СД-1 в состоянии компенсации углеводного обмена и в группе риска является компенсаторным механизмом и играет защитную роль.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что регуляция системы FasL/Fas влияет на тропность аутореактивных Т-клеток к островковым антигенам больных СД-1, и что Fas-индуцированная гибель β -клеток, опосредованная Т-лимфоцитами, играет существенную роль в развитии и прогрессировании СД-1 как в латентной стадии, так и на этапе развернутых клинических проявлений заболевания.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и выражают благодарность за сотрудничество коллективу эндокринологического отделения Елизаветинской городской больницы и специалистам лаборатории клеточного и гуморального иммунитета Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины МЧС МЗ РФ г. Санкт-Петербурга за предоставление базы для обследования пациентов.

Список литературы

- Васина А.В., Луговая А.В., Петрищев Н.Н., Серебряная Н.Б. Патогенетическое значение изменения относительного содержания аннексина V⁺-мононуклеаров и CD 59⁺-лимфоцитов периферической крови при остром коронарном синдроме. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2008. (1): 14–24.
- Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях. РИО Уро РАН. — Екатеринбург. — 2018. — 720 с.
- Луговая А.В., Калинина Н.М., Митрейкин В.Ф., Ковальчук Ю.П., Артемова А.В., Белолипетская Ю.Р., Гаврилова Е.А., Рузанова О.С., Эмануэль В.С., Эмануэль Ю.В., Эмануэль В.А. Апоптоз и пролиферация Т-лимфоцитов периферической крови как альтернативные процессы в патогенезе сахарного диабета первого типа. Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». 2019. 1 (4): 16–20.
- Петрищев Н.Н., Васина А.В., Луговая А.В. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексина V-связанных апоптотических клеток в крови больных острым коронарным синдромом. Вестник Санкт-Петербургского государственного университета. 2008. (1): 14–24.
- Фефелова Е.В., Терешков П.П., Максимова М.В., Цыбилов Н.Н. Индукция апоптоза лимфоцитов под влиянием гомоцистеина в культуре клеток периферической крови больных ИБС. Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке». 2016. 18 (11): 36–39.
- Хайтов Р.М. Иммунология. М. ГЭОТАР-Медиа. 2018. — 496 с.
- Abstracts of 52nd EASD Annual Meeting. Diabetologia. 2016. 59 (1): 581 p.
- Baidwan S., Chekuri A., Hynds D.L., Kowluru A. Glucotoxicity promotes aberrant activation and mislocalization of Fas-related C3 botulinum toxin substrate 1 [Rac1] and metabolic dysfunction in pancreatic islet β -cells: reversal of such metabolic defects by metformin. Apoptosis. 2017. 22 (11): 1380–1393.
- Bhatraju P.K., Robinson-Cohen C., Mikacenic C. et al. Circulating levels of soluble Fas (sCD95) are associated with risk for development of a nonresolving acute kidney injury subphenotype. Crit. Care. 2017. 21 (217): 1–9. DOI: 10.1186/s13054-017-1807-x.
- Blander J.M. The many ways tissue phagocytes respond to dying cells. Immunol. Rev. 2017. 277 (1): 158–173.
- Cantley J., Davenport A., Vetterli L. et al. Disruption of beta cell acetyl-CoA carboxylase-1 in mice impairs insulin secretion and beta cell mass. Diabetologia. 2019. 62 (1): 99–111.
- Esposito M.D., Matarrese P., Tinari A. et al. Changes in membrane lipids drive increased endocytosis following Fas ligation. Apoptosis. 2017. 22 (5): 681–695.
- Garg A.D., Romano E., Rufo N., Agostinis P. Immunogenic versus tolerogenic phagocytosis during anticancer therapy mechanisms and clinical translation. Cell Death Differ. 2016. 23: 938–951.
- Green D.R. Cell death and the immune system: getting to how and why. Immunol. Rev. 2017. 277 (1): 4–8.
- Green D.R., Oguin T.H., Martinez J. The clearance of dying cells: table for two. Cell Death Differ. 2016. 23: 915–926.
- Hakonen E., Chandral V., Fogarty C.L. et al. MANF protects human pancreatic beta cells against stress-induced cell death. Diabetologia. 2018. 61 (10): 2202–2214.
- Hammes H.P. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. Diabetologia. 2018. 61 (1): 29–38.
- Joglekar M.V., Trivedi P.M., Kay T.W. et al. Human islet cells are killed by BID-independent mechanisms in response to Fas ligand. Apoptosis. 2016. 21 (4): 379–389.
- Li X., Shang B., Li Y. et al. IFN γ and TNF α synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells via the induction of nitric oxide. Stem Cell Res. Ther. 2019. 10 (18): 1–11. DOI: 10.1186/s13287-018-1102-z.
- Liang L., Ge K., Zhang F. et al. The suppressive effect of co-inhibiting PD-1 and CTLA-4 expression on H22 hepatomas in mice. Cell. Mol. Biol. Lett. 23 (58): 1–11. 2018. DOI: 10.1186/s11658-018-0122-0.
- Liphaus B.L., Kiss M.H.B., Carrasco S. et al. Increased serum sFas, sTRAIL, and reduced sFasL in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. Clin. Rheumatol. 2017. 36 (12): 2847–2852.
- Nabipour I., Kalantarhormozi M., Assadi M. et al. Influence of levothyroxine treatment on serum levels of soluble Fas (CD95) and Fas Ligand (CD95L) in chronic autoimmune hypothyroidism. Endocr. 2010. 38 (3): 406–411.
- Rieux-Laucat F., Magéris-Chatinet A., Neven B. The Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome with Defective Fas or Fas-Ligand Functions. J. Clin. Immunol. 2018. 38 (5): 558–568.
- Rossin A., Lounnas N., Jérôme Durivault J. et al. The Btk-dependent PIP5K1 γ lipid kinase activation by Fas counteracts FasL-induced cell death. Apoptosis. 2017. 22 (11): 1344–1352.
- Sachet M., Liang Y.Y., Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. Apoptosis. 2017. (22) 10: 1189–1204.
- Shukla V., Shukla A.K., Perez-Pinzon M.A. et al. Cerebral ischemic damage in diabetes: an inflammatory perspective. Journal of Neuroinflammation. 2017. 14 (21): 1–22. DOI: 10.1186/s12974-016-0774-5.
- Sidarala V., Kowluru A. Exposure to chronic hyperglycemic conditions results in Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1)-mediated activation of p53 and ATM kinase in pancreatic β -cells. Apoptosis. 2017. 22 (5): 597–607.
- Tchorzewski H., Glowacka M., Banasik P. et al. Activated T lymphocytes from patients with high risk of type 1 diabetes mellitus have different ability to produce interferon- γ , interleukin-6 and interleukin-10 and undergo anti-CD95 induced apoptosis after insulin stimulation. Immunology Letters. 2001. 75: 225–234.
- Uchiyama R., Tsutsui H. Caspases as the Key Effectors of Inflammatory Responses Against Bacterial Infection. Immunol. Ther. Exp. 2015. 63 (1): 1–13.
- Vives-Pi M., Rodríguez-Fernández S., Pujol-Autonell I. How apoptotic β -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review. Apoptosis. 2015. (20) 3: 263–272.
- Xv J., Ming Q., Wang X. et al. Mesenchymal stem cells moderate immune response of type 1 diabetes. Cell Tissue Res. 2017. 368 (2): 239–248.
- Zhang M., Zhang L., Hu J. et al. MST1 coordinately regulates autophagy and apoptosis in diabetic cardiomyopathy in mice. Diabetologia. 2016. 59 (11): 2435–2447.

Для цитирования. Луговая А.В., Калинина Н.М., Митрейкин В.Ф., Эмануэль Ю.В., Ковальчук Ю.П., Артемова А.В., Эмануэль В.С., Мусихина Ю.В., Эмануэль В.А. Оценка эффективности Fas-опосредованного апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных сахарным диабетом I типа // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 26–32.



Точная диагностика -
эффективное лечение!

Наборы реагентов

» для количественного определения цитокинов методом ИФА

№ по каталогу	определяемый цитокин	чувствительность анализа	диапазон измерений
A-8752	Гамма-Интерферон – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6008 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации гамма-интерферона в сыворотке крови	2 пг/мл	0-1000 пг/мл
A-8754	Интерлейкин – 4 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6009 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-4 в сыворотке крови	0,4 пг/мл	0-100 пг/мл
A-8756	Альфа – ФНО – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/5961 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора некроза опухоли – альфа в сыворотке крови	1 пг/мл	0-250 пг/мл
A-8758	Альфа – Интерферон – ИФА – БЕСТ РУ № ФСР 2008/02195 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации альфа-интерферона в сыворотке крови	5 пг/мл	0-500 пг/мл
A-8760	Альфа – Интерферон – аутоиммунные антитела – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2014/2056 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации аутоиммунных антител к альфа-интерферону в сыворотке крови человека	0,4 нг/мл	0-100 пг/мл
A-8762	Интерлейкин – 8 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6005 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-8 в сыворотке крови и моче человека	2 пг/мл	0-250 пг/мл
A-8766	Интерлейкин – 1 бета – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6010 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-1 бета в сыворотке крови и моче человека	1 пг/мл	0-250 пг/мл
A-8768	Интерлейкин – 6 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6006 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-6 в сыворотке крови и моче человека	0,5 пг/мл	0-300 пг/мл
A-8770	Интерлейкин – 8 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2014/2083 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-8 в сыворотке крови человека	2 пг/мл	0-1000 пг/мл
A-8772	Интерлейкин – 2 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6012 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-2 в сыворотке крови человека	2 пг/мл	0-500 пг/мл
A-8774	Интерлейкин – 10 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/6011 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерлейкина-10 в сыворотке крови человека	1 пг/мл	0-500 пг/мл
A-8776	Эритропоэтин – ИФА – БЕСТ РУ № ФСР 2010/09378 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации эритропоэтина в сыворотке (плазме) крови	0,5 мМЕ/мл	0-200 мМЕ/мл
A-8782	МСР – 1 – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/5969 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации моноцитарного хемотоксического белка-1 в сыворотке крови.	15 пг/мл	0-2000 пг/мл
A-8784	VEGF – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2017/5974 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови.	10 мЕд/мл	0-2000 мЕд/мл

Срок хранения наборов – 18 месяцев

АО «Вектор-Бест»

630117, Новосибирск, а/я 492
т.: (383) 227-73-60, 332-81-34,
т./факс: 332-67-49, 332-67-52,
e-mail: vbmarket@vector-best.ru
www.vector-best.ru

Представительства:

Москва: (495) 710-76-96
Санкт-Петербург: (812) 495-55-99
Ростов-на-Дону: (863) 295-15-61
Екатеринбург: (343) 372-90-50

Уфа: (347) 246-23-34
Нижний Новгород: (831) 270-48-53
Хабаровск: (4212) 335-946
Киев: (10 380 44) 338-04-04

Информативность цитокинового профиля в прогнозировании осложнений у больных инфарктом миокарда на фоне хронической обструктивной болезни легких

А. В. Наумов, аспирант¹

Л. В. Сароянц, д.м. н, зав. лабораторно-экспериментальным отделом²

Т. В. Прокофьева, к.м.н., доцент¹

О. С. Полунина, д.м.н., проф., зав. кафедрой¹

Е. А. Полунина, к.м.н., доцент¹

¹Кафедра внутренних болезней педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Астрахань

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России, г. Астрахань

Informativeness of cytokine profile in predicting complications in patients with myocardial infarction on background of chronic obstructive pulmonary disease

A. V. Naumov, L. V. Saroyants, T. V. Prokofyeva, O. S. Polunina, E. A. Polunina

Astrakhan State Medical University, Leprosy Research Institute; Astrakhan, Russia

Резюме

Цель. Определить информативность цитокинового профиля (ИЛ-1β, ИЛ-2 и ИЛ-6) в прогнозировании осложнений у больных инфарктом миокарда (ИМ) на фоне хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). **Материалы и методы.** Было обследовано 85 человек: 28 больных ИМ, 37 больных с коморбидной патологией (ИМ + ХОБЛ) и 20 соматически здоровых добровольца в качестве группы контроля. Определение уровней ИЛ-1β, ИЛ-2 и ИЛ-6 проведено методом твердофазного иммуноферментного анализа. **Результаты.** При оценке цитокинового профиля у больных ИМ и ИМ на фоне ХОБЛ наиболее выраженные различия между группами больных отмечались в уровнях ИЛ-6. При анализе ассоциации уровня ИЛ-6 с наличием ранних осложнений ИМ было установлено, что уровень ИЛ-6 у больных с осложненным ИМ достоверно выше, чем у больных с неосложненным течением. Самый высокий уровень ИЛ-6 регистрировался в подгруппе больных с осложненным течением ИМ на фоне ХОБЛ. Изучение уровней ИЛ-6 в зависимости от вида осложнений ИМ показало, что максимально высокие значения ИЛ-6 регистрировались в группе коморбидных пациентов с кардиогенным шоком и отеком легких. **Заключение.** При определении цитокинового статуса у больных ИМ на фоне ХОБЛ следует в качестве основного показателя рассматривать уровень ИЛ-6. Данный цитокин можно считать маркером левожелудочковой недостаточности, развивающейся в остром периоде у больных ИМ на фоне ХОБЛ.

Ключевые слова: цитокины, интерлейкины, инфаркт миокарда, хроническая обструктивная болезнь легких, коморбидная патология.

Summary

Objective. To determine the information content of the cytokine profile (IL-1β, IL-2 and IL-6) in predicting complications in patients with myocardial infarction (MI) against the background of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Materials and methods.** In 85 people were examined: 28 patients with myocardial infarction, 37 patients with comorbid pathology (MI + COPD) and 20 somatically healthy volunteers as a control group. Determination of IL-1β, IL-2 and IL-6 levels was basing on enzyme immunoassay. **Results.** When assessing the cytokine profile in patients with MI and MI against the background of COPD, the most pronounced differences between groups of patients were observed in the levels of IL-6. Analyzing the association of the level of IL-6 with the presence of early complications of MI, it was found that the level of IL-6 in patients with complicated MI was significantly higher than in patients with uncomplicated course. The highest level of IL-6 was recorded in the subgroup of patients with complicated myocardial infarction during COPD. Studying the levels of IL-6 depending on the type of complications of myocardial infarction showed that the highest values of IL-6 were recorded in the group of comorbid patients with cardiogenic shock and pulmonary edema. **Conclusion.** When determining the cytokine status in patients with myocardial infarction on the background of COPD, the level of IL-6 should be considered as the main indicator. This cytokine can be considered a marker of left ventricular that developed in the acute period in patients with myocardial infarction on the background of COPD.

Key words: cytokines, interleukins, myocardial infarction, chronic obstructive pulmonary disease, comorbid pathology.

Введение

ХОБЛ и сердечно-сосудистая патология представляют собой яркий пример взаимоотношающихся патологических состояний, что обусловлено идентичностью факторов риска и единством ряда патогенетических звеньев [6]. Одним из таких звеньев является хроническое воспаление, определенная роль в котором

отводится цитокиновой активации. Высвобождающиеся интерлейкины и хемокины способствуют развитию дисфункции эндотелия, акселерации процессов атерогенеза и гиперкоагуляции [4].

В литературе имеются данные исследований иммунологических сдвигов при острых формах ИБС [1, 7]

и при ХОБЛ [2, 3]. Работы по изучению цитокинового профиля у коморбидных пациентов с ИМ на фоне ХОБЛ [5, 6] единичны. Между тем оценка цитокинового профиля может способствовать углублению знаний о патогенезе и взаимовлиянии кардиореспираторной патологии, оказать помощь в оценке тяжести острой

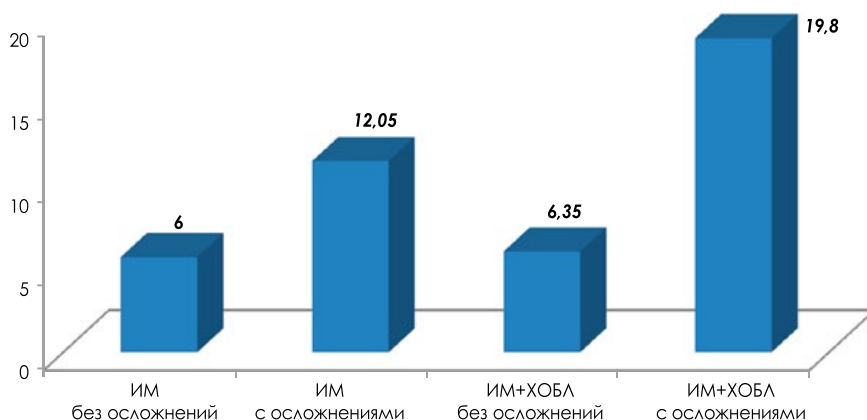


Рисунок. Уровень ИЛ-6 (пг/мл) в обследованных группах в зависимости от наличия осложнений в остром периоде инфаркта миокарда.

коронарной патологии у больных ХОБЛ и прогнозировании течения ИМ.

Цель

Определить информативность цитокинового профиля (ИЛ-1 β , ИЛ-2 и ИЛ-6) в прогнозировании осложнений у больных ИМ на фоне ХОБЛ.

Материалы и методы

Было обследовано 65 больных, разделенных на две группы. Первую группу составили больные ИМ ($n = 28$), вторую — больные с ИМ на фоне ХОБЛ ($n = 37$). Группу контроля составили 20 соматически здоровых добровольцев Астраханского региона.

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации. Проведение исследования одобрено этическим комитетом (заседание РНЭК от 15 сентября 2016 г., протокол № 1).

Обследование осуществлялось в условиях регионального сосудистого центра Александрo-Мариинской областной клинической больницы в 2016–17 гг. Возраст обследованных составил от 45 до 65 лет (средний возраст $54,8 \pm 2,4$ года). Все обследованные лица были сопоставимы по возрасту и полу.

Диагноз ХОБЛ с определением стадии заболевания устанавливался по рекомендациям, представленным программой «Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилак-

тики хронической обструктивной болезни легких» (пересмотр 2014 г.). У 70 % больных ХОБЛ отмечалась тяжелая степень тяжести заболевания. Средняя длительность ХОБЛ составила 17,5 года. Средний индекс массы тела больных составил $28,2 \text{ кг/м}^2$.

ИМ развился на фоне уже верифицированного диагноза ХОБЛ. Постановка диагноза и лечение острого ИМ осуществлялись по общепризнанным стандартам специализированной медицинской помощи при остром ИМ. Критериями включения являлись наличие у пациентов документированного ИМ с подъемом сегмента ST не более 12 часов от момента ангинозного приступа, подтвержденного результатами ЭКГ и сывороточными маркерами некроза, ХОБЛ в анамнезе, возраст до 65 лет, а также информированное согласие на участие в исследовании.

Кровь на исследование брали утром натощак в пробирки без консервантов. Определение уровней ИЛ-1 β , ИЛ-2 и ИЛ-6 было основано на методе твердофазного иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител к соответствующему интерлейкину. Использовались наборы реагентов компании «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия).

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием пакета прикладных программ Statistica 11.0 (StatSoft, США). Вычисляли медиану и интерперцентильные размахи (Me, 25-й и 75-й перцентили). Для сравнения количественных признаков между

двумя независимыми группами применяли непараметрический критерий U Манна-Уитни. Наличие и силу связи между изучаемыми показателями оценивали с помощью непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Отличия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Во всех обследуемых группах больных уровни изучаемых цитокинов были статистически значимо выше по сравнению с группой контроля (табл. 1). У больных ИМ уровень ИЛ-1 β составил $11,2 [9,6–17,4]$ пг/мл, у больных ИМ на фоне ХОБЛ — $13,7 [10,8–19,5]$ пг/мл. В обоих случаях это было достоверно выше, чем в группе контроля — $5,1 [4,7–6,9]$ пг/мл ($p < 0,05$).

Уровень ИЛ-2 составил $19,2 [14,7–24,7]$ пг/мл у больных ИМ и $24,1 [16,1–27,8]$ пг/мл у больных ИМ на фоне ХОБЛ, достоверно превышая значения данного показателя в группе контроля — $4,2 [2,2–7,7]$ пг/мл ($p < 0,01$).

Уровень ИЛ-6 у больных ИМ составил $8,6 [6,1–19,9]$ пг/мл, у больных ИМ на фоне ХОБЛ — $15,6 [6,5–28,4]$ пг/мл, что в обоих случаях статистически значимо ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно) отличалось от значений в группе контроля — $0,97 [0,2–4,2]$ пг/мл. Примечательно, что при сравнении групп больных ИМ и ИМ на фоне ХОБЛ между собой достоверные различия сохранялись только для ИЛ-6.

Учитывая, что наиболее выраженные различия между группами больных отмечались в значениях ИЛ-6, нам представлялось целесообразным проанализировать ассоциацию уровня этого интерлейкина с наличием ранних осложнений ИМ. Больные в обследуемых группах были разделены на подгруппы в зависимости от наличия или отсутствия осложнений в остром периоде ИМ. Среди обследованных пациентов течение заболевания без осложнений на госпитальном этапе отмечалось у 17 больных ИМ и у 14 больных ИМ на фоне ХОБЛ. Осложненное течение заболевания наблюдалось у 11

больных ИМ и у 23 больных ИМ на фоне ХОБЛ. Полученные данные представлены на рисунке.

Уровни ИЛ-6 не имели статистически значимых отличий в группах с неосложненным течением ИМ в качестве мононозонологии и неосложненным течением ИМ на фоне ХОБЛ — 6,0 [5,7–14,9] и 6,36 [4,55–7,25] пг/мл соответственно. Уровень ИЛ-6 у больных с осложненным ИМ в качестве мононозонологии составил 12,05 [7,5–18,4] пг/мл, что было статистически значимо выше, чем у больных с осложненным течением ИМ в качестве мононозонологии. Самый высокий уровень ИЛ-6 регистрировался в подгруппе больных с осложненным течением ИМ на фоне ХОБЛ.

В дальнейшем была предпринята попытка проанализировать уровни ИЛ-6 в зависимости от вида осложнений ИМ. Среди осложнений ИМ в остром периоде отмечались: острая левожелудочковая недостаточность, проявившаяся кардиогенным шоком и отеком легких, и пароксизмальные нарушения ритма и проводимости. Полученные результаты представлены в табл. 2.

У больных ИМ, осложненным нарушениями ритма и проводимости, уровень ИЛ-6 составил 16,3 [7,4–22,6] пг/мл, у больных ИМ на фоне ХОБЛ с аналогичными осложнениями — 8,6 [2,2–16,8] пг/мл, между собой различия не были статистически значимы.

У больных с явлениями острой левожелудочковой недостаточности в остром периоде заболевания регистрировались более высокие показатели ИЛ-6. Так, при наличии кардиогенного шока у больных ИМ уровень ИЛ-6 составил 17,3 [7,4–22,6] пг/мл, а у больных ИМ на фоне ХОБЛ — 23,2 [12,4–26,5] пг/мл. Полученные значения превышали уровни ИЛ-6 у пациентов с нарушениями ритма и проводимости в соответствующих группах ($p < 0,05$). Уровень ИЛ-6 у больных ИМ на фоне ХОБЛ был достоверно выше, чем в группе больных ИМ ($p < 0,05$).

Среди пациентов с отеком легких уровень ИЛ-6 составил 15,1 [7,4–19,5] пг/мл у больных ИМ и 20,1

Таблица 1
Значение уровней ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6 в обследуемых группах

Показатель	Контроль, n = 20	ИМ, n = 28	ИМ+ХОБЛ, n = 37
ИЛ-1 β , пг/мл	5,1 [4,7–6,9]	11,2 [9,6–17,4]*	13,7 [10,8–19,5]*
ИЛ-2, пг/мл	4,2 [2,2–7,7]	19,2 [14,7–24,7]**	24,1 [16,1–27,8]**
ИЛ-6, пг/мл	0,97 [0,2–4,2]	8,6 [6,1–19,9]*	15,6 [6,5–28,4]***

Примечание: * — статистически значимые различия с группой контроля (* $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$); ° — статистически значимые различия с группой больных ИМ (° — $p < 0,05$, °° — $p < 0,01$); в скобках 25-й и 75-й процентиля.

Таблица 2
Уровни ИЛ-6 в зависимости от вида осложнений ИМ на госпитальном периоде

Осложнение	ИМ, n = 11	ИМ + ХОБЛ, n = 23
Нарушения ритма и проводимости	5,7 [1,4–10,9]	8,6 [2,2–16,8]
Кардиогенный шок	17,3 [7,4–22,6]*	23,2 [12,4–26,5]°°
Отек легких	15,1 [7,4–19,5]*	20,1 [10,4–28,9]°°

Примечание: * — статистически значимые различия с больными с нарушениями ритма и проводимости в данной группе (* $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$); ° — статистически значимые различия с больными ИМ с аналогичным осложнением ИМ ($p < 0,05$; °° — $p < 0,01$); в скобках 25-й и 75-й процентиля.

[10,4–28,9] пг/мл у больных ИМ на фоне ХОБЛ. Полученные значения достоверно превышали уровни ИЛ у больных с нарушениями ритма в данных группах и были сопоставимы с уровнями ИЛ у больных с кардиогенным шоком в соответствующих группах. Уровень ИЛ-6 у больных ИМ на фоне ХОБЛ достоверно превышал соответствующий показатель у больных ИМ в качестве мононозонологии.

Заключение

При оценке цитокинового профиля у больных ИМ и ИМ на фоне ХОБЛ было выявлено статистически значимое повышение уровней ИЛ-1 β , ИЛ-2 и ИЛ-6 по сравнению с группой контроля. Наиболее выраженные различия между группами больных отмечались в уровнях ИЛ-6. Его значения были максимальными у больных ИМ на фоне ХОБЛ и были достоверно выше соответствующих значений в группе больных ИМ. Можно предположить, что выброс провоспалительных цитокинов из очага воспаления в системный кровоток на фоне обострения ХОБЛ может быть фактором, провоцирующим развитие острой коронарной патологии [8, 9].

При анализе ассоциации уровня ИЛ-6 с наличием ранних осложнений ИМ было установлено, что уровень ИЛ-6 у больных с осложненным ИМ был достоверно выше, чем у больных с неосложненным течением ИМ. Наиболее высокий уровень ИЛ-6 регистрировался в подгруппе больных с осложненным течением ИМ на фоне ХОБЛ.

При осложненном течении ИМ максимально высокие значения ИЛ-6 регистрировались у пациентов с кардиогенным шоком и отеком легких. В этих подгруппах они были достоверно выше, чем в группе пациентов с ИМ с нарушениями ритма. В группе коморбидных пациентов с явлениями левожелудочковой недостаточности уровень ИЛ-6 был выше, чем у аналогичных пациентов с ИМ в качестве мононозонологии. Эти данные согласуются с результатами исследования Шаленковой М. А. с соавт. (2014), выявившей прямую зависимость уровня ИЛ-6 от тяжести его течения ИМ и осложнений [7]. В исследованиях Ritschel V. (2017) у пациентов с ИМ выявлена ассоциация уровня растворимого рецептора ИЛ-6 и риска ранней смерти и повторного ИМ [10].

Особенностью нашего исследования стало изучение цитокинового

статуса у коморбидных пациентов, больных ИМ, на фоне ХОБЛ. Полученные данные свидетельствуют о том, что при определении цитокинового статуса у больных ИМ на фоне ХОБЛ следует в качестве основного показателя рассматривать уровень ИЛ-6. Повышенный уровень ИЛ-6, выявленный в данном исследовании, ассоциируется с высоким риском осложнений ИМ в остром периоде заболевания. Данный цитокин можно считать маркером левожелудочковой недостаточности (кардиогенного шока и отека легких), развившейся в остром периоде у больных ИМ на фоне ХОБЛ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Список литературы

1. Аляви А. Л., Низомов А. А., Касимова Г. М. Клинико-диагностическое значение активации цитокинов и возможности коррекции нарушений у больных острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST. // Тезисы Рос. нац. конгр. кардиологов. — 2012. — № 0024. — С. 43–44.
2. Атякшин Д. А., Цветикова А. Н., Лобеева Н. В., А. В. Будневский, Е. С. Овсянников. Показатели иммунного статуса при хронической обструктивной болезни легких // Успехи современного естествознания. — 2015. — № 9. — С. 195–197. www.natural-sciences.ru/ru/article/view?id=35558 (дата обращения: 17.10.2018).
3. Виткина Т. И., Денисенко Ю. К., Сидлецкая К. А. Изменение экспрессии рецептора к ИЛ-6 на поверхности иммунокомпетентных клеток при прогрессировании хронической обструктивной болезни легких // Медицинская иммунология. — 2017. — Т. 19. — № 2. — С. 191–196. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-191-196.
4. Межирова Н. М., Данилова В. В., Овчаренко С. С. Патологические и диагностические аспекты синдрома системного воспалительного ответа. // Медицина неотложных состояний. — 2011. — 1 (2). — С. 32–33.
5. Поликутина О. М., Слепынина Ю. С., Баздырев Е. Д., Каретникова В. Н., Барбараш О. Л. Исходы инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких в Кемеровской области. // Рос. кард. жур. — 2014. — № 7 (111). — С. 91–97.
6. Провоторов В. М., Будневский А. В., Семенова Г. Г., Шишкина Е. С. Провоспалительные цитокины при сочетании ишемической болезни сердца и хронической обструктивной болезни легких. // Клини. мед. — 2015. — № 93 (2). — С. 5–9.
7. Шаленкова М. А., Михайлова З. Д., Манюкова Э. Т., Басагина Т. А., Шишкина А. П. Уровни содержания интерлейкинов и мелатонина у больных острым коронарным синдромом. // Медицинская иммунология. — 2014. — Т. 16. — № 5. — С. 473–480. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-191-196 (in Russ.).
8. Kunadian V., Chan D., Ali H., Wilkinson N., Howe N., McColl E., Thornton J., von Wilmowitz-Moellendorf A., Holstein E. M., Burns G., Fisher A., Stocken D., De Souza A. Antiplatelet therapy in the primary prevention of cardiovascular disease in patients with chronic obstructive pulmonary disease: protocol of a randomised controlled proof-of-concept trial (APPLE COPD-ICON2) // BMJ Open. — 2018. — Vol. 8. — № 5. — P. e020713. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-020713.
9. La Torre G., Cocchiara R. A., Sordo E. L., Chiarianni M., Siliquini R., Firenze A., Maurici M., Agati L., Saulle R., Mannocci A. J. Counseling intervention to improve quality of life in patients with pre-existing acute myocardial infarction (AMI) or chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a pilot study // J Prev Med Hyg. — 2018. — Vol. 59. — № 2. — P. E153–E158.
10. Ritschel V., Shetelig C., Seljelot L., et al. Evaluation of circulating levels of CCN2/connective tissue growth factor in patients with ST-elevation myocardial infarction. // Scientific Reports volume 7, Article number: 11945 (2017).

Для цитирования. Наумов А. В., Сароянц А. В., Прокофьева Т. В., Полунина О. С., Полунина Е. А. Информативность цитокинового профиля в прогнозировании осложнений у больных инфарктом миокарда на фоне хронической обструктивной болезни легких // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 33–36.

Уважаемые коллеги!

Приглашаем 19–20 сентября 2019 года врачей трансфузиологов, гематологов, анестезиологов-реаниматологов, хирургов, специалистов клинической лабораторной диагностики, акушеров-гинекологов, ревматологов, нефрологов и других специалистов принять участие в работе II Ежегодной научно-практической конференции «Современные трансфузиологические технологии для медицинской практики. Год 2019: проблемы системы гемостаза. Анемии».

19 сентября — бизнес-отель «Аэростар», 1-й этаж, зал «Петровский» (г. Москва, Ленинградский проспект, 37, корп. 9).

20 сентября — конференц-зал Боткинской больницы, учебный центр для медицинских работников — Медицинский симуляционный центр Боткинской больницы (г. Москва, 2-й Боткинский пр-д, 5, корп. 22).

Мероприятие проводится при научно-методической поддержке организационно-методического отдела по трансфузиологии Департамента здравоохранения г. Москвы под эгидой главного внештатного специалиста-трансфузиолога ДЗМ проф. Буланова Андрея Юльевича.

Данная конференция включена в план конгрессно-выставочной деятельности под патронатом Департамента здравоохранения г. Москвы на 2019 год.

В рамках научной программы будут обсуждаться фундаментальные, клинические и трансфузионные проблемы:

- профилактика и преодоление резистентности к трансфузии тромбоцитов в гематологической клинике;
- оценка показаний для трансфузии тромбоцитов при массивном кровотечении;
- назначение антитромботической терапии пациентам с тромбоцитопенией в сосудистой клинике;
- проведение диализа пациентам с гепарининдуцированной тромбоцитопенией;
- ведение беременности у пациенток с тромбоцитопенией;
- эффективность вирус-инактивированных донорских тромбоцитов.

II ЕЖЕГОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

**СОВРЕМЕННЫЕ
ТРАНСФУЗИОЛОГИЧЕСКИЕ
ТЕХНОЛОГИИ
ДЛЯ МЕДИЦИНСКОЙ
ПРАКТИКИ**

ГОД 2019

ПРОБЛЕМЫ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА. АНЕМИИ

Организаторами подана заявка в координационный совет по развитию непрерывного медицинского образования с целью получения участниками баллов НМО.

Участие в конференции бесплатное.

Регистрация на сайтах: transfusiology.com

и med-marketing.ru/meropriyatiya/meropriyatiya_1316.html.

Контакты: оргкомитет научно-практических учебных мероприятий «Московская трансфузиология»

info@transfusiology.com

+7 (495) 641-82-39

transfusiology.com

Взаимосвязь профилей антинуклеарных антител и цитокинов при системной красной волчанке

Е. Н. Александрова, д.м.н., зав. лабораторией клинической иммунологии¹

А. А. Новиков, д.б.н., вед.н.с. лаборатории клинической иммунологии¹

Ж. Г. Верижникова, врач КЛД лаборатории иммунодиагностики²

Т. А. Панафидина, к.м.н., н.с. лаборатории системных ревматических заболеваний²

Г. В. Лукина, д.м.н., проф., зав. отделом ревматологии¹, вед.н.с. лаборатории мониторинга безопасности антиревматических препаратов²

¹ГБУЗ г. Москвы «Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова» Департамента здравоохранения г. Москвы

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой», г. Москва

Relationship of profiles of antinuclear antibodies and cytokines in systemic lupus erythematosus

E. N. Aleksandrova, A. A. Novikov, Zh. G. Verizhnikova, T. A. Panafidina, G. V. Lukina

A. S. Loginov Moscow Clinical Research and Practical Center, Moscow Healthcare Department, V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology; Moscow, Russia

Резюме

Системная красная волчанка (СКВ) — системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся патологической активацией врожденного и приобретенного иммунного ответа, образованием антинуклеарных антител (АНА) и дисрегуляцией продукции цитокинов. Цель работы: изучить взаимосвязь профилей АНА и цитокинов у больных СКВ при использовании мультиплексного иммунного анализа (МИА) данных биомаркеров. Обследовано 94 больных СКВ (критерии диагноза SLICC, 2012) и 28 здоровых доноров. Профили АНА и цитокинов в сыворотке крови определяли на основе суспензионной микрочиповой технологии xMAP. При СКВ наиболее часто выявлялись антитела к dsDNA (52,1%), нуклеосомам (54,3%) и SS-A/Ro (37,2%), реже к Sm (28,7%), RibP (14,9%), RNP-70 (13,8%) и SS-B/La (11,7%). Активность заболевания (SLEDAI-2K) положительно коррелировала с концентрацией антител к dsDNA ($r = 0,6$), нуклеосомам ($r = 0,7$), Sm ($r = 0,4$) и RibP ($r = 0,3$) ($p < 0,05$). В сыворотках больных СКВ идентифицировано повышение уровней IL-4, -6, -8, -12, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 β , RANTES и снижение содержания IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-9, IL-10, эотаксина, G-CSF, IFN- γ , MIP-1a, TNF- α , FGF, PDGF-BB, VEGF по сравнению с донорами ($p < 0,05$). Увеличение концентрации IP-10 и MCP-1 ассоциировалось с высокой активностью заболевания ($r = 0,4$; $r = 0,3$; $p < 0,05$), гиперпродукцией антител к dsDNA ($r = 0,3$), нуклеосомам ($r = 0,5$), Sm ($r = 0,5$), SS-B/La ($r = 0,3$), RibP ($r = 0,4$) ($p < 0,05$) и антител к Sm ($r = 0,3$), SS-B/La ($r = 0,3$), RibP ($r = 0,3$) ($p < 0,05$) соответственно. Вывод: образование АНА и высокая активность СКВ ассоциируются с гиперэкспрессией хемокинов IP-10 и MCP-1, индуцируемых IFN.

Ключевые слова: системная красная волчанка, антинуклеарные антитела, цитокины, активность заболевания, мультиплексный иммунный анализ.

Summary

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease characterized by pathological activation of the innate and acquired immune response, the formation of antinuclear antibodies (ANA), and dysregulation of cytokine production. Objective: to study the relationship of ANA and cytokine profiles in patients with SLE using multiplex immune analysis (MIA) of these biomarkers. We examined 94 patients with SLE (SLICC diagnosis criteria, 2012) and 28 healthy donors. Profiles of ANA and cytokines in blood serum were determined on the basis of suspension microarray technology xMAP. In SLE, antibodies to dsDNA (52.1%), nucleosomes (54.3%) and SS-A/Ro (37.2%), less often to Sm (28.7%), RibP (14.9%), RNP-70 (13.8%) and SS-B/La (11.7%). Disease activity (SLEDAI-2K) positively correlated with the concentration of antibodies to dsDNA ($r = 0.6$), nucleosomes ($r = 0.7$), Sm ($r = 0.4$) and RibP ($r = 0.3$) ($p < 0.05$). In the sera of patients with SLE, an increase in the levels of IL-4, -6, -8, -12, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 β , RANTES and a decrease in the content of IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-9, IL-10, eotaxin, G-CSF, IFN- γ , MIP-1a, TNF- α , FGF, PDGF-BB, VEGF compared to donors ($p < 0.05$). An increase in the concentration of IP-10 and MCP-1 was associated with high disease activity ($r = 0.4$; $r = 0.3$; $p < 0.05$), hyperproduction of antibodies to dsDNA ($r = 0.3$), nucleosomes ($r = 0.5$), Sm ($r = 0.5$), SS-B/La ($r = 0.3$), RibP ($r = 0.4$) ($p < 0.05$) and antibodies to Sm ($r = 0.3$), SS-B/La ($r = 0.3$), RibP ($r = 0.3$) ($p < 0.05$), respectively. Conclusion: the formation of ANA and high activity of SLE are associated with the overexpression of chemokines IP-10 and MCP-1 induced by IFN.

Key words: systemic lupus erythematosus, antinuclear antibodies, cytokines, disease activity, multiplex immune assay.

Системная красная волчанка (СКВ) — системное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся гиперпродукцией органонеспецифических аутоантител к различным компонентам клеточного ядра с развитием иммуновоспалительного повреждения тканей и внутренних органов [1]. В основе патогенеза СКВ лежат генетически детерминированные и индуцированные факторами

внешней среды многообразные нарушения врожденного и приобретенного иммунитета, в том числе патологическая активация В- и Т-клеток, образование широкого спектра аутоантител, дисрегуляция продукции цитокинов, дефекты клиренса апоптотических клеток и иммунных комплексов [2–5]. Антинуклеарные антитела (АНА) являются основными серологическими маркерами СКВ. В сыворотках больных СКВ обнару-

живаются антитела к ДНК, гистонам, нуклеосомам, экстрагируемым ядерным антигенам (Sm, U1 рибонуклеопротеину — РНП, SS-A/Ro, SS-B/La, рибосомальному белку Р — RibP), ядрышковым антигенам и другим клеточным структурам [6, 7]. Положительные результаты определения АНА входят в число диагностических критериев СКВ; применяются для оценки активности, прогноза и характеристики клинко-лабораторных

субтипов заболевания; служат предикторами развития СКВ на доклинической стадии [6, 8–10]. АНА прямо или через формирование иммунных комплексов с ядерными антигенами, образующимися в процессе нетоза, апоптоза и некроза клеток, индуцируют персистирующую стимуляцию мембранных рецепторов (Toll-подобных рецепторов TLR 7 и TLR 9; FcγRIIIa) плазматоидных дендритных клеток, моноцитов/макрофагов, нейтрофилов, Т- и В-лимфоцитов, усиливают продукцию интерферона альфа (IFN-α), В-лимфоцитарного стимулятора (BLyS) и других провоспалительных цитокинов (интерлейкинов IL-6, IL-8, IL-1β, IL-12, IL-21, IL-22, IL-23, IL-17, IL-18, фактора некроза опухоли альфа TNF-α), активируют систему комплемента, а также механизмы комплементзависимой и антителозависимой клеточной цитотоксичности, что приводит к воспалению и деструкции тканей организма [2, 3, 5, 11]. Учитывая важную роль АНА в патогенезе СКВ, большинством исследователей ставится под сомнение существование серонегативной по антиядерным антителам формы данного заболевания [12]. К патогенетически значимым цитокинам при СКВ относят BLyS, IFN-α, IL-6, IL-17, IL-12, IL-23, TNF-α, IFN-γ-индуцибельный белок (IP-10), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), которые усиливают продукцию аутоантител, поддерживают воспалительный процесс и могут быть использованы в качестве мишеней для терапии генно-инженерными биологическими препаратами [2, 3, 5, 13, 14]. Увеличение сыровоточной концентрации хемокинов CXCL10 (IP-10), CCL2 (моноцитарного хемоаттрактного белка-1 — MCP-1) и CCL19 (макрофагального белка воспаления-3В — MIP-3В), регулируемых IFN, тесно коррелирует с активностью люпус-нефрита и обострением заболевания [15]. К потенциальным биомаркерам активности СКВ относят также BLyS [16], другие цитокины (TNF-α, антагонист рецептора IL-1 — IL-1ra, IFN-α, IL-6, IL-10, IL-18, CD40L) [2, 17, 18]. У больных активной формой СКВ или неполным

волчаночным синдромом с риском прогрессирования заболевания регистрируется высокий уровень экспрессии генов, индуцируемых IFN I типа (type I IFN gen signature), который коррелирует с увеличением концентрации IgG антител к дсДНК, нуклеосомам, U1 РНП, SS-A/Ro, SS-B/La, в то время как низкий уровень экспрессии данных генов сопровождается продукцией менее патогенных АНА класса IgM [19]. Обнаружение за три с половиной года и более до клинической манифестации СКВ профиля биомаркеров, включающего АНА (антитела к дсДНК, нуклеосомам, SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, Sm/РНП, РНП), цитокины (IL-5, IL-6) и монокин из семейства CXС хемокинов, индуцированный IFN-γ (MIG), прогнозирует развитие данного заболевания с точностью 92 % [20].

Применение мультиплексных технологий, обладающих более высокой аналитической чувствительностью по сравнению с классическим мультиплексным методом иммуноферментного анализа и возможностью одновременного определения большого количества показателей, позволяет идентифицировать профили АНА и цитокинов, ассоциированные с различными субфенотипами СКВ, расширить представления о патогенетическом и предиктивном значении данных биомаркеров [21–25]. Вместе с тем имеющиеся в литературе результаты мультиплексного иммунного анализа (МИА) профилей АНА и цитокинов при СКВ варьируют в зависимости от особенностей тест-систем (биоципов, антигенов), пределов референтных интервалов исследуемых показателей, подбора групп больных и нуждаются в уточнении.

Цель работы: изучить взаимосвязь профилей АНА и цитокинов у больных СКВ при использовании МИА данных биомаркеров.

Пациенты и методы

Обследованы 94 пациента с достоверным диагнозом СКВ (критерии SLICC, 2012) [8] (14 мужчин и 80 женщин) в возрасте 35,9 (16,0–65,0) года с длительностью заболевания

113,5 (2,0–576,0) месяца, наблюдавшихся в НИИР имени В. А. Насоновой в 2014–2017 годах. Активность заболевания по шкале SLEDAI-2K составляла 9,7 (0–40) балла, индекс повреждения SLICC/ACR Damage Index соответствовал 1,6 (0–18) балла. Большинство больных имели хроническое течение заболевания (61 %), 23 % — острое, 16 % — подострое. Среди клинических проявлений преобладали суставной синдром (85 %), поражения кожи и слизистых оболочек (47 %), волчаночный нефрит (53 %). 97 % больных СКВ были серопозитивными по антиядерному фактору в непрямой реакции иммунофлюоресценции на HEp-2-клетках. В контрольную группу вошли 28 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными. Образцы сывороток крови хранились при –70 °С.

Исследование профилей АНА (антител к дсДНК, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, нуклеосомам, рибосомальному белку Р — RibP, рибонуклеопротеину — РНП-70) и 27 цитокинов в сыворотке крови осуществляли методом МИА на основе суспензионной микрочиповой технологии xMAP (BioPlex® 2200 ANA Screen и Bio-Plex® 200 Human Grp I Cytokine 27-plex panel; Bio-Rad Laboratories, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Позитивные результаты измерения антител к дсДНК соответствовали значениям ≥ 10,0 МЕ/мл, других разновидностей АНА ≥ 1,0 ЕД.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft, США), включая методы параметрического и непараметрического анализа. Для параметров, распределение которых отличалось от нормального, при сравнении двух групп использовали критерий Манна-Уитни, а при сравнении трех и более групп — критерий Краскелла-Уоллеса; результаты представлены в виде медианы [Me] с интерквартильным интервалом [ИИ] 25–75-го процентилей. Корреляционный анализ проводился с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 1
Частота обнаружения АНА в сыворотках
94 больных СКВ

АНА	п, %
Антитела к дсДНК	49 (52,1)
Антитела к Sm	27 (28,7)
Антитела к нуклеосомам	51 (54,3)
Антитела к SS-A/Ro	35 (37,2)
Антитела к SS-B/La	11 (11,7)
Антитела к РНП-70	13 (13,8)
Антитела к RibP	14 (14,9)

Результаты исследования

При СКВ наиболее часто выявлялись антитела к дсДНК (52,1 %), нуклеосомам (54,3 %) и SS-A/Ro (37,2 %), реже — антитела к другим ядерным антигенам (Sm, RibP, РНП-70, SS-B/La) (28,7–11,7 %) (табл. 1). Индекс активности заболевания SLEDAI-2K положительно коррелировал с концентрацией антител к дсДНК ($r = 0,6$; $p < 0,05$), нуклеосомам ($r = 0,7$; $p < 0,05$), Sm ($r = 0,4$; $p < 0,05$) и RibP ($r = 0,3$; $p < 0,05$).

В сыворотках больных СКВ отмечалось снижение уровней IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-9, IL-10, эотаксина, G-CSF, IFN- γ , MIP-1 α , TNF- α , FGF, PDGF-BB, VEGF и повышение концентраций IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 β , RANTES по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров ($p < 0,05$); содержание IL-5, IL-7, IL-13, IL-15 и IP-10 не отличалось от нормы ($p > 0,05$) (табл. 2). Таким образом, цитокиновый профиль при СКВ характеризовался низкими или нормальными значениями медианы концентраций большинства провоспалительных, противовоспалительных, Th-1 и Th-2 цитокинов, колониестимулирующих и ангиогенных факторов (за исключением высоких уровней IL-6, IL-12 и GM-CSF) и гиперэкспрессией хемокинов IL-8, MCP-1, MIP-1 β , RANTES, а также основного Th-2-цитокина — IL-4. Гиперпродукция хемокинов IP-10 и MCP-1 ассоциировалась с повышением индекса активности заболевания SLEDAI-2K ($r = 0,4$, $p < 0,05$; $r = 0,3$, $p < 0,05$) и увеличением сы-вороточной концентрации антител

Таблица 2
Концентрация цитокинов в сыворотках больных СКВ и здоровых доноров

Цитокины (пгг/мл)	СКВ, n = 80	Здоровые доноры, n = 28	p
Провоспалительные			
IL-1 β	1,7 (1,3–2,9)	4,3 (2,6–5,1)	0,000075
TNF- α	15,5 (11,9–21,4)	38,9 (21,8–66,0)	0,000764
IL-2	14,5 (9,3–17,7)	10,8 (5,0–14,4)	0,023539
IL-6	13,7 (9,0–21,9)	6,8 (4,3–13,1)	0,000097
IL-15	11,9 (0,0–28,4)	7,8 (4,0–19,1)	0,935177
Th1			
IL-12	16,8 (10,8–30,9)	5,6 (2,2–9,6)	0,000001
IFN- γ	92,5 (63,4–140,3)	175,9 (112,3–966,0)	0,000007
Th2			
IL-4	11,0 (8,8–13,2)	2,5 (0,2–5,8)	0,000001
IL-5	2,0 (1,7–2,7)	1,5 (0,2–5,2)	0,478648
IL-9	10,5 (7,7–19,8)	34,2 (27,2–41,7)	0,000001
IL-13	11,1 (4,8–29,7)	16,7 (9,1–22,7)	0,633549
Eotaxin	22,5 (11,2–39,7)	88,6 (18,1–590,0)	0,000084
Антивоспалительные			
IL-1ra	57,3 (44,6–113,3)	145,2 (109,1–234,4)	0,000001
IL-10	8,5 (5,9–11,4)	13,2 (5,7–44,5)	0,052989
Колониестимулирующие факторы			
IL-7	3,9 (2,6–6,4)	6,3 (0,4–20,0)	0,73118
GM-CSF	129,1 (53,7–226,8)	39,9 (15,4–56,5)	0,000066
G-CSF	6,1 (1,2–13,0)	12,0 (2,4–21,4)	0,042468
Стромальные и ангиогенные факторы			
FGF	10,3 (8,1–15,1)	27,3 (19,8–42,3)	0,000001
PDGF-BB	2335,3 (1698,2–3176,2)	16338,8 (5320,5–56472,8)	0,000001
VEGF	61,9 (34,1–116,3)	205,6 (91,1–313,8)	0,000054
Хемокины			
IL-8	29,6 (13,4–149,7)	12,5 (4,7–15,9)	0,000003
IP-10	772,0 (439,0–1450,4)	349,3 (188,1–3452,1)	0,47024
MCP-1	130,1 (57,8–246,2)	51,5 (22,0–123,6)	0,000203
MIP-1 α	3,9 (2,2–11,1)	10,8 (8,8–16,6)	0,000084
MIP-1 β	136,5 (86,9–232,1)	70,2 (52,2–99,5)	0,000051
RANTES	22066,8 (14804,6–28439,7)	1809,3 (1802,3–6169,5)	0,000001

Примечание: IL — интерлейкин; TNF- α — фактор некроза опухоли α ; IFN- γ — интерферон- γ ; IL-1ra — антагонист рецептора IL-1; GM-CSF — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; G-CSF — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; FGF — фактор роста фибробластов; PDGF-BB — фактор роста тромбоцитов-BB; VEGF — васкулоэндотелиальный фактор роста; IP-10 — IFN- γ -индуцибельный белок-10; MCP-1 — моноцитарный хемоаттрактантный белок-1; MIP — макрофагальный белок воспаления; RANTES — хемокин, выделяемый T-клетками при активации.

к дсДНК ($r = 0,3$), нуклеосомам ($r = 0,5$), Sm ($r = 0,5$), SS-B/La ($r = 0,3$), RibP ($r = 0,4$) ($p < 0,05$) и антител к Sm ($r = 0,3$), anti-SS-B/La ($r = 0,3$),

anti-RibP ($r = 0,3$) ($p < 0,05$) соответственно. Уровни IL-1 β , IL-15 и IL-8 негативно коррелировали с концентрацией антител к дсДНК ($r = -0,3$),

RibP ($r = -0,3$) ($p < 0,05$) и SS-A/Ro ($r = -0,3$) ($p < 0,05$) соответственно. Отмечалась положительная корреляция между уровнями противовоспалительных цитокинов IL-10, IL-1ra и антител к Sm ($r = 0,3$), SS-B/La ($r = 0,3$), SS-A/Ro ($r = 0,3$) ($p < 0,05$). Повышение концентрации GM-CSF сопровождалось снижением уровня антител к Sm-антигену ($r = -0,3$) ($p < 0,05$).

Обсуждение результатов

С помощью МИА в сыворотках больных СКВ идентифицирован профиль АНА и цитокинов, характеризующийся наличием антител к семи ядерным антигенам (дсДНК, нуклеосомам, Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, RibP, РНП-70) и повышением уровней IL-4, -6, -12, хемокинов IL-8, MCP-1, MIP-1 β , RANTES и колониестимулирующего фактора GM-CSF. Показано, что увеличение сывороточной концентрации антител к дсДНК, нуклеосомам, Sm, RibP, а также хемокинов IP-10 и MCP-1, индуцированных IFN, ассоциируется с высокой активностью СКВ. Обнаружена положительная корреляция между уровнями АНА (антител к дсДНК, нуклеосомам, Sm, SS-B/La, RibP) и концентрацией IP-10, MCP-1 в крови. Сходные результаты при одновременном определении профилей АНА и цитокинов у больных СКВ с использованием мультиплексных технологий получены другими авторами [24, 25]. Y. Pacheco и соавт. [24] выявили повышенные средние уровни IFN- α , IL-6, -8, -10, -12/23p40, -17A, TNF α , G-CSF и нормальные концентрации IL-1 β , -2, -4, -5, -9, -13, IFN- γ в сыворотках у 67 больных СКВ. В работе были проанализированы три кластера аутоантител (1 — нейтральный с преобладанием АНА и низкой частотой обнаружения других аутоантител; 2 — с преобладанием антифосфолипидных антител; 3 — с преобладанием антител к дсДНК и экстрагируемым ядерным антигенам) и четыре кластера цитокинов (1 — нейтральный с низкими уровнями цитокинов; 2 — хемокиновый с доминированием IL-8; 3 — с доминированием G-CSF; 4 — провоспа-

лительный с доминированием IFN- α и в меньшей степени IL-12/23p40, TNF- α , IL-17A, G-CSF, IL-10). В отличие от наших результатов, уровни АНА не коррелировали с показателями активности заболевания, вместе с тем все четыре кластера цитокинов достоверно отражали активность СКВ по индексу SLAQ ($p = 0,022$). У пациентов с активной СКВ было выделено три интегративных кластера аутоантител и цитокинов, при этом первый кластер характеризовался низкими уровнями цитокинов и преобладанием АНА, второй — доминированием хемокина IL-8 и антифосфолипидных антител, третий — высокими уровнями IFN- α и антител к дсДНК. В нашем исследовании также отмечались повышенные уровни IL-6, -8, -12 и низкие или нормальные концентрации IL-1 β , -2, -5, -9, -13, IFN- γ в сыворотках больных СКВ, при этом гипопродукция IL-1 β , -8–15 ассоциировалась с увеличением титров АНА (антител к дсДНК, SS-A/Ro и RibP), однако уровни цитокинов (за исключением IP-10 и MCP-1) не коррелировали с активностью заболевания, что может быть обусловлено использованием разных индексов для подсчета активности патологического процесса. J. A. Reynolds и соавт. [25] распределили больных СКВ ($n = 96$) на три группы, две из которых характеризовались высокой активностью заболевания (по индексам SLEDAI-2K и BILAG-2004) и высокими уровнями IFN- α , BlyS (I группа) или CXCL10 (IP-10), CXCL13 (В-лимфоцитарного хемоаттрактанта BLC) (II группа), в то время как III группа имела низкую активность заболевания и низкие уровни цитокинов в сыворотке крови. В I группе доминирование IFN- α и BlyS сочеталось с возрастанием IL-10, -17, -21; во II группе гиперпродукция хемокинов сопровождалась увеличением концентрации антител к дсДНК, гипокплементией и развитием артритов, что подтверждается нашими данными о положительной корреляции хемокинов IP-10 и MCP-1 с индексом активности SLEDAI-2K и уровнями антител к дсДНК, нуклеосомам,

Sm, RibP. Другими исследователями также обнаружена взаимосвязь между увеличением сывороточной концентрации хемокинов MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), MIP-3B (CCL19), IP-10 (CXCL10), SIGLEC-1, CXCL1, CXCL16, индуцируемых IFN, повышением активности СКВ и гиперпродукцией АНА [2, 26, 27]. Как известно, среди цитокинов потенциальными биомаркерами активности СКВ являются TNF- α , IL-1ra, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15 [2, 17, 23]. В нашей работе повышение уровней этих цитокинов не коррелировало с индексом активности SLEDAI-2K. При этом нами обнаружена положительная корреляция между уровнями IL-10, IL-1ra и антител к Sm, SS-B/La, SS-A/Ro, в то время как уровни IL-1 β , IL-15, IL-8 и GM-CSF негативно коррелировали с концентрацией антител к дсДНК, RibP, SS-A/Ro и Sm. Полученные результаты указывают на существование различных иммунологических субфенотипов СКВ, отражающих гетерогенность данного многофакторного заболевания, однако имеют предварительный характер и требуют дальнейшего изучения.

Выводы

Образование АНА и высокая активность СКВ ассоциируются с гиперэкспрессией хемокинов IP-10 и MCP-1, индуцируемых IFN. МИА профилей АНА и цитокинов является важным инструментом для реализации персонализированного подхода к оценке иммунологических субтипов СКВ.

Список литературы

1. Соловьев С. К., Ключкина Н. Г. Системная красная волчанка. В книге: Насонов Е. Л., редактор. Ревматология: Клинические рекомендации. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010. С. 429–81.
2. Liu CC, Kao AH, Manzi S, Ahearn JM. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther Adv Musculoskeletal Dis.* 2013; 5: 210–33.
3. Podolska MJ, Biermann MH, Maureröder C, Hahn J, Herrmann M. Inflammatory etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: an update. *J Inflamm Res.* 2015; 8: 161–71.
4. Arriens C, Wren JD, Munroe ME, Mohan C. Systemic lupus erythematosus biomarkers: the challenging quest. *Rheumatology (Oxford).* 2017; 56 (suppl. 1): i32–i45.

5. Zharkova O, Celhar T, Cravens PD, Satterthwaite AB, Fairhurst AM, Davis LS. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2017; 56 (suppl. 1): i55–i66.
6. Александрова Е. Н., Новиков А. А., Насонов Е. Л. Лабораторная диагностика ревматических заболеваний. В кн.: Насонов Е. Л., ред. Российские клинические рекомендации. Ревматология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017. С. 300–18.
7. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73 (1): 17–23.
8. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012; 64 (8): 2677–86.
9. Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J Immunol Res*. 2014; 2014: 315179.
10. Bizzaro N, Tozzoli R, Shoenfeld Y. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? *Arthr Rheum*. 2007; 56: 1736–44.
11. Dörner T. Deciphering the role of NETs and networks in SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2012; 8: 68–70.
12. Pisetsky DS. Antinuclear antibody testing — misunderstood or misbegotten? *Nat Rev Rheumatol*. 2017; 13 (8): 495–502.
13. Yap DI, Lai KN. The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus — from bench to bedside. *Nephrology*. 2013; 18: 243–55.
14. Squatrito D, Emmi G, Silvestri E, Ciucciarelli L, D'Elios MM, Prisco D, Emmi L. Pathogenesis and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus: from bench to bedside. *Auto Immun Highlights*. 2014; 5 (2): 33–45.
15. Bauer JW, Petri M, Batliwalla FM, Koeuth T, Wilson J, Slattery C et al. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: a validation study. *Arthritis Rheum*. 2009; 60: 3098–107.
16. Petri M, Stohl W, Chatham W, McCune W, Chevrier M, Ryel J et al. Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: 2453–9.
17. Chun HY, Chung JW, Kim HA, Yun J, Jeon J, Ye Y et al. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol*. 2007; 27: 461–6.
18. Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: II. Markers of disease activity. *Arthritis Rheum*. 2004; 50: 2048–65.
19. Li QZ, Zhou J, Lian Y, Zhang B, Branch VK, Carr-Johnson F et al. Interferon signature gene expression is correlated with autoantibody profiles in patients with incomplete lupus syndromes. *Clin Exp Immunol*. 2010; 159 (3): 281–91.
20. Lu R, Munroe ME, Guthridge JM, Bean KM, Fife DA, Chen H et al. Dysregulation of innate and adaptive serum mediators precedes systemic lupus erythematosus classification and improves prognostic accuracy of autoantibodies. *J Autoimmun*. 2016; 74: 182–193.
21. Zhu H, Luo H, Yan M, Zuo X, Li QZ. Autoantigen microarray for high-throughput autoantibody profiling in Systemic Lupus Erythematosus. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015; 13 (4): 210–8.
22. Wang L, Mohan C, Li QZ. Arraying autoantibodies in SLE — Lessons Learned. *Curr Mol Med*. 2015; 15 (5): 456–61.
23. Adhya Z, Borozdenkova S, Karim MY. The role of cytokines as biomarkers in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26 (10): 3273–80.
24. Pacheco Y, Barahona-Correa J, Monsalve DM, Acosta-Ampudia Y, Rojas M, Rodríguez Y et al. Cytokine and autoantibody clusters interaction in systemic lupus erythematosus. *J Transl Med*. 2017; 15 (1): 239.
25. Reynolds JA, McCarthy EM, Haque S, Ngamjanyaporn P, Sergeant JC, Lee E et al. Cytokine profiling in active and quiescent SLE reveals distinct patient subpopulations. *Arthritis Res Ther*. 2018; 20 (1): 173.
26. Bauer J, Baechler E, Petri M, Batliwalla F, Crawford D, Ortmann W et al. Elevated serum levels of interferon-regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus. *PLoS Med*. 2006; 3 (12): e 491.
27. Kirou K, Lee C, George S, Louca K, Peterson M, Crow M. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 1491–1503.

Для цитирования. Александрова Е. Н., Новиков А. А., Верижникова Ж. Г., Панафидина Т. А., Лукина Г. В. Взаимосвязь профилей антинуклеарных антител и цитокинов при системной красной волчанке // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 37–42.



Маленькие шаги к большой победе над гепатитом С

Разделить большое бремя вирусных гепатитов на малые части и сложить без них картину мира из пазлов победы над инфекцией в отдельных группах пациентов... Это самый эффективный путь к выполнению глобальной задачи Всемирной организации здравоохранения — элиминировать вирусные гепатиты. Сейчас лечение получают в первую очередь самые уязвимые группы пациентов. В основном это люди с циррозом печени. Но важно не забывать и о сложных пациентах, зараженных в медицинских условиях.

Эксперты сходятся во мнении, что особое внимание следует уделять лечению детей, тем более что впервые появилась возможность безинтерфероновой терапии гепатита С у подростков старше 12 лет.

Немногие регионы могут позволить себе масштабные программы лечения вирусных гепатитов. В Москве ежегодно от гепатита С лечат все больше пациентов. В других регионах с трудом удастся добиться лечения 50–200 пациентов в год. И это лучшие примеры.

Марина Русанова, к.м.н, врач-инфекционист высшей категории, заведующая дневным стационаром центра по лечению хронических вирусных гепатитов ГБУЗ

«Инфекционная клиническая больница № 1» Департамента здравоохранения г. Москвы подчеркивает: «Очень важно, чтобы каждый житель Москвы с хроническим вирусным гепатитом был направлен в наш центр и прошел полное обследование. Наша задача — расставить приоритеты, кому в первую очередь назначать терапию, и грамотно подобрать схему лечения, чтобы мы могли пролечить как можно больше пациентов. Каждый год терапию от гепатита С получают все больше больных в рамках региональных и государственных программ: в 2016 году было пролечено 1900, в 2017 году — уже 2676, а в 2018 году — 3695 пациентов».

Самая сложная — выбрать, кому в первую очередь оказать помощь, когда средств на лечение всех нуждающихся не хватает.

В России гепатит С значительно распространен среди детей и подростков, чем в странах Европы и в США. Порядка 13,2 млн детей в возрасте от 1 до 15 лет болеют хроническим вирусным гепатитом С в мире. В России, по данным Референс-центра по мониторингу за вирусными гепатитами, инфицированы почти 17 тыс. детей в возрасте до 17 лет.

Чаще всего российские дети заражаются гепатитом С в медицинских учреждениях и от матерей. Для подростков также, как и для взрослых, актуальными являются такие факторы риска, как пирсинг и нанесение татуировок, маникюр и педикюр, если при этих манипуляциях используется недостаточно качественно стерилизованный инструментарий или нестерильная краска для татуировок.

Проблема лечения гепатита С у детей и подростков дольше всего оставалась нерешенной. В то время когда количество современных, эффективных и безопасных опций для лечения хронического гепатита у взрослых постоянно расширялось, детские специалисты могли использовать только интерфероновые схемы терапии. В некоторых случаях они спасали детские жизни, когда болезнь начинала активно развиваться, но назначались с осторожностью и только в случаях ухудшений. И, увы, далеко не всегда помогали.

В 2019 году ситуация в России изменилась. Теперь подросткам в возрасте от 12 лет также стало доступно эффективное и безопасное лечение хронического гепатита С.



DIALAB GmbH, Австрия

Гликозилированный гемоглобин HbA1c



Одно из лучших предложений на HbA1c

HbA1c (иммунотурбидиметрия) доступен для каждой лаборатории

Также в
наличии:

Гомоцистеин (прямой ферментативный метод),
Цистатин С, для всех открытых систем
иммунотурбидиметрический метод

Биохимические реагенты
Иммунотурбидиметрия



Тест полоски для анализа мочи
на 1-11 параметров *

Лучшая
цена



Экспресс-тесты высокого
качества на ВИЧ, Гепатит В,
Гепатит С, Сифилис, Тропонин I,
Кардио Комбо (TrI, Myo, CK-MB) и др.



Анализаторы мочевых полосок
(120 и 500 тестов в час) *



STRIP ANALYSER 500
(500 полосок/час)

Акция



STRIP READER 40
(120 полосок/час)

Акция

* - до завершения регистрации не является изделием медицинского назначения

Продукция компании DIALAB GmbH, Австрия
Тел.: (812) 340-00-19, факс: (812) 340-00-31
e-mail: office@dialab-russia.ru

www.dialab-russia.ru

Особенности методов оценки скорости клубочковой фильтрации

И. А. Волкова, к.м.н., доцент кафедры
М. И. Савина, д.б.н., проф. кафедры

Кафедра клинической лабораторной диагностики факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

Features of methods of glomerular filtration rate estimation

I. A. Volkova, M. I. Savina

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

Резюме

Снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) является более ранним признаком выявления хронических заболеваний почек по сравнению с повышением концентрации мочевины и креатинина крови. Прямо измерить скорость клубочковой фильтрации невозможно. Определение СКФ проводится расчетом по концентрации креатинина крови или измерением клиренса по эндогенному креатинину. В работе показано влияние методов определения креатинина на результаты расчета скорости клубочковой фильтрации и условия для правильного выбора способа измерения скорости клубочковой фильтрации в разных клинических ситуациях, связанных с хроническими заболеваниями почек.

Ключевые слова: креатинин, скорость клубочковой фильтрации, клиренс, хронические заболевания почек.

Summary

A decrease in glomerular filtration rate (GFR) is an earlier sign of detection of chronic kidney diseases compared to an increase in urea and blood creatinine concentrations. It is impossible to measure the glomerular filtration rate directly. GFR is determined by calculating the concentration of blood creatinine or by measuring the clearance of endogenous creatinine. The work shows the influence of methods for the determination of creatinine on the results of the calculation of glomerular filtration rate and terms for the correct choice of method of measuring glomerular filtration rate in different clinical situations associated with chronic kidney disease.

Key words: creatinine, glomerular filtration rate, clearance, chronic kidney disease.

При установленных заболеваниях почек основными способами лабораторной оценки их состояния является серийное определение концентрации мочевины и креатинина в сыворотке крови [2]. Концентрация креатинина крови преимущественно зависит от скорости клубочковой фильтрации (СКФ), то есть количества мл плазмы крови, которое профильтровалось через клубочки почек за 1 минуту, поэтому определение уровня креатинина является более информативным методом оценки фильтрационной способности почек по сравнению с мочевиной.

Латентно протекающие хронические заболевания почек (ХЗП) встречаются при первичном поражении почек и как осложнение других заболеваний, в частности, сахарного диабета и гипертонической болезни. Для выявления хронических заболеваний почек на ранних стадиях определение уровней мочевины и креатинина в сыворотке крови недостаточно информативно, так как их концентрации существенно повышаются при поражении патологическим процессом около половины нефронов [3], что связано с высокими компенсаторными возможностями почек. К более ранним маркерам выявления ХЗП относятся снижение СКФ и альбуминурия, которые могут проявляться по отдельности или одновременно [10].

Непосредственное измерение СКФ с помощью лабораторных тестов невозможно, но ее можно оценить путем использования косвенных методов. В настоящее время СКФ определяется расчетными и клиренсовыми методами. Расчет СКФ основан на концентрации в сыворотке крови

креатинина или цистатина С [4, 8]. Условия использования сывороточного цистатина С для оценки СКФ пока недостаточно разработаны [10], поэтому концентрация креатинина крови является основным показателем для расчета СКФ.

Клиренсовые методы основаны на измерении концентрации известного вещества в сыворотке или плазме крови и моче. Клиренс — это количество мл плазмы крови, которое очистилось от определяемого вещества за 1 минуту. Условиями выбора измеряемого аналита является наличие его фильтрации в клубочках почек при отсутствии реабсорбции и секреции в канальцах. С 30-х годов прошлого века в качестве доступного для исследования вещества используется эндогенный (образованный внутри организма) креатинин, концентрация которого определяется в крови и моче, а способ оценки назван пробой Реберга-Тареева или клиренсом по эндогенному креатинину.

Таким образом, используемые в рутинной практике методы базируются на определении концентрации креатинина.

Методы определения концентрации креатинина: возможности и ограничения

Основным рутинным методом измерения концентрации креатинина остается реакция со щелочным пикратом — смесью растворов пикриновой кислоты и едкого натра — NaOH (реакция Яффе). Все больше в лабораторную практику чаще сетевых и независимых лабораторий входят различные варианты ферментативных тестов. Дефинитив-

Таблица 1
Ориентировочные референтные значения концентрации креатинина, измеренного разными методами

Метод определения	Ориентировочные референтные значения для возрастной группы 18–60 лет	
Креатинин по Яффе Кинетический метод	М	62–115 мкмоль/л
	Ж	53–97 мкмоль/л
Креатинин Ферментативный метод	М	55–96 мкмоль/л
	Ж	40–66 мкмоль/л

ные (окончательные, наиболее точные) методы, такие как масс-спектрометрия, проводятся в специализированных лабораториях в основном для определения концентрации креатинина в калибраторах, контрольном материале и др.

Креатинин определяют в сыворотке или плазме крови и моче. Результаты анализа сыворотки и плазмы крови считаются одинаковыми [7]. Креатинин сыворотки крови остается стабильным при хранении пробы в течение 24 часов при комнатной температуре и после повторного замораживания [5]. В связи с высоким содержанием креатинина в моче перед определением концентрации креатинина мочу разводят в 50–100 раз физиологическим раствором с последующим умножением результата на степень разведения.

Метод определения креатинина со щелочным пикратом

Метод Яффе является наиболее распространенным методом измерения концентрации креатинина, но его характеризует низкая аналитическая специфичность. На результаты определения креатинина влияют белки, глюкоза, ацетоуксусная кислота, соединения с двойными и тройными связями, а также некоторые лекарственные препараты. Определяемые совместно с креатином соединения приводят к неспецифическому и не поддающемуся учету завышению результатов, которое в среднем составляет 15–25 % [10]. В настоящее время для определения концентрации креатинина используют кинетический метод (двухточечная кинетика, он же метод фиксированного времени). Измерение концентрации креатинина кинетическим методом повышает специфичность метода [11], что приводит к получению более низких значений концентрации и лучше соответствует уровню креатинина пациента.

В связи с относительно низкой специфичностью реакции для получения сопоставимых результатов приготовление реагентов и методика анализа должны проводиться по стандартной операционной процедуре (СОП), принятой в лаборатории.

Определение концентрации креатинина ферментативными методами

Ферментативные методы определения концентрации креатинина отличаются высокой аналитической специфичностью и чувствительностью. На результаты определения практически не влияют посторонние вещества, поэтому ферментативные методы отражают реальную

концентрацию креатинина пациента. Уровень креатинина, измеренный ферментативным методом, будет ниже по сравнению с кинетическим определением по Яффе.

Надежность результатов измерения независимо от используемого метода зависит от качества калибратора. Для получения адекватных результатов калибратор должен быть аттестован дефинитивными методами, например масс-спектрометрией. В этом случае результаты анализов пациента будут в большей степени соответствовать истинной концентрации креатинина. Правильность измерения концентрации креатинина должна быть подтверждена результатами внешней оценки качества (ВОК).

Креатинин сыворотки крови

Уровень креатинина в сыворотке крови определяется мышечной массой, полом, возрастом, иногда расой пациента. Референтные значения содержания креатинина устанавливаются, как правило, в соответствии с рекомендациями поставщиков реагентов в соответствии с методом исследования, полом и возрастом пациента (табл. 1). Референтные значения могут отличаться в разных лабораториях даже при одинаковых методах измерения показателя, поэтому при оценке результата надо ориентироваться на референтные пределы, указанные в бланке анализа.

При использовании реагентов другого производителя референтные значения для креатинина могут меняться, но направление изменений сохраняется: у женщин значения меньше, чем у мужчин, что связано с более низкой мышечной массой.

Концентрации креатинина, определенные разными методами или в разных лабораториях, могут существенно отличаться. Допустимая межлабораторная вариация при использовании одного и того же метода составляет около 12 % [10]. В бланке анализа пациента следует указывать метод исследования креатинина, что пока не является обязательным, но влияет на оценку расчета СКФ. Для получения достоверных результатов и динамического наблюдения, необходимого для выявления ХЗП, исследования рекомендуется проводить одним и тем же методом предпочтительно в одной и той же лаборатории. При проведении исследований разными методами или в разных лабораториях могут быть получены результаты, не поддающиеся клинической интерпретации.

Концентрация креатинина в системе СИ измеряется в мкмоль/л. При измерении в мг/дл фактор пересчета составляет 88,4: мкмоль/л = мг/дл × 88,4. При первичном обследовании пациентов с вероятностью ХЗП в перечень анализов надо включать определение концентрации креатинина крови.

Оценка изменения содержания креатинина по критической разнице RCV%.

При снижении СКФ наблюдается постепенное повышение уровня креатинина крови. В связи с индивидуальностью нормы, то есть гомеостатическими показателями каждого здорового человека, диагностически значимый рост уровня креатинина может находиться внутри зоны референтных интервалов [3], а значения концентрации креатинина, которые некоторые авторы рассматривают

Таблица 2
Оценка изменения содержания креатинина путем критической разницы у двух пациентов
при первичном и повторном плановых обследованиях

Параметр	1-й пациент	2-й пациент
Креатинин 1-е определение, мкмоль/л	70	70
Креатинин 2-е определение, мкмоль/л	78	85
ИКП%	$(78-70) / 70 \times 100 = 11,4\%$	$(85-70) / 70 \times 100 = 21\%$
Заключение	ИКП% < RCV% (11,4 < 15,0) Изменение незначимо	ИКП% > RCV% (21 > 15) Изменение значимо

Примечание: ИКП% — изменение концентрации креатинина пациента, %.

как пограничные для расчета СКФ [10], не могут однозначно использоваться для всех пациентов. Оценка повышения концентрации креатинина при повторных исследованиях по отношению к исходной концентрации креатинина позволяет делать предварительные выводы о возможном снижении СКФ. Оценка проводится сравнением разницы изменения концентрации креатинина пациента в процентах с критической разницей RCV% (reference change value), которая является современным объективным критерием.

$RCV\% \text{ для креатинина} = 2,77 \text{ CVi}\% = 2,77 \times 5,3\% = 14,6\% (\approx 15\%),$

где CVi — коэффициент индивидуальной вариации, который для креатинина составляет 5,3%. CVi для различных анализов опубликованы на сайте Вестгарда, который обновляется каждые два года [12].

Расчет изменения концентрации креатинина пациента (ИКП%) проводится по отношению к первому измерению. Изменение диагностически значимо, если ИКП% больше RCV% (для креатинина более 15%).

Пример расчета и оценки по RCV% представлен в табл. 2.

У первого пациента изменение незначимо. Расчет СКФ можно не проводить.

Оценка способом сравнения с критической разницей подходит для любого метода измерения креатинина, проведенного в одинаковых условиях.

Сравнение ИКП% с RCV% пока не является частью стандартного обследования пациента, однако превышение изменения концентрации креатинина пациента в процентах (ИКП%) значения RCV% могут служить объективным основанием для последующего расчета СКФ по креатинину крови.

При ИКП% меньше RCV% расчет СКФ проводить нецелесообразно.

Расчет СКФ по креатинину крови

Формулы для расчета СКФ являются эмпирическими, поэтому содержат ряд не поддающихся учету неустраняемых погрешностей. В последние годы формулы совершенствовались и усложнялись, что повышает адекватность результатов, но требует использования специального калькулятора.

Формула Кокрофта-Голта (Cockcroft-Gault) — первая разработанная формула для оценки СКФ у взрослых, которая позволяет рассчитать СКФ по креатинину плазмы или сыворотки крови с учетом возраста и массы пациента.

$СКФ = K [(140 - \text{возраст, лет}) \times \text{масса кг} / \text{креатинин плазмы}],$

где K — коэффициент, для мужчин равный 1,23, а для женщин — 1,05 в связи с более низкой мышечной массой, креатинин измеряется в мкмоль/л.

Недостатками формулы является необходимость приведения результатов к стандартной площади поверхности тела 1,73 м². Площадь поверхности тела пациента (Sm²) рассчитывается по номограмме или формулам.

Формула MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) расчета СКФ является более современной, учитывает пол, возраст, расу пациента. Расчет проводится на стандартную площадь поверхности тела 1,73 м².

$СКФ (\text{мл/мин.}) = 175 \times (P_{cr}/88,4)^{-1,154} \times (\text{годы})^{-0,203} \times (0,742, \text{ женщины}) \times (1,212),$

где P_{cr} — креатинин плазмы в мкмоль/л, фактор 1,212 для африканцев.

Уравнение используется при подозрении на ХЗП (СКФ ниже 60 мл/мин.).

Формула CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) — самая современная формула расчета СКФ, которая учитывает пол, возраст, расу. Расчет проводится на стандартную площадь поверхности тела 1,73 м².

$GFR = 141 \times \min \{Scr/k, 1\}^\alpha \times \max \{Scr/k, 1\}^{-1,209} \times 0,993^{\text{годы}} \times 1,018 [Ж] \times 1,159 [A],$

где S_{cr} — креатинин плазмы мкмоль/л; k — 61,9 для женщин (Ж) и 79,6 для мужчин, α — 0,329 для женщин и 0,411 для мужчин, A — африканцы.

Расчет лучше соотносится с референтными методами определения СКФ [1].

Калькуляторы для расчета можно найти на сайтах mdrd.com и kdep.nih.gov [1] и ввести в приложения современного мобильного телефона. Формулы предназначены для взрослых. Аналогичные формулы для детей — Шварцца и Коунахана [1].

Общим недостатком формул является их неточность при нормальных или незначительно сниженных значениях СКФ.

Оценка расчетной СКФ

Референтные значения СКФ для мужчин составляют 90–150 мл/мин., а для женщин — 90–130 мл/мин. Регламентирующим значением ХЗП является СКФ 60 мл/мин., так как ее снижение до 60 мл/мин. наблюдается при повреждении около половины нефронов. СКФ менее

Таблица 3

Расчет СКФ по формуле Кокрофта-Голта на основании результатов определения креатинина разными методами

Пациентки	Расчет СКФ по креатинину (кинетический метод Яффе)		Расчет СКФ по креатинину (ферментативный метод)	
	Креатинин, мкмоль/л	СКФ, мл/мин.	Креатинин, мкмоль/л	СКФ, мл/мин.
Первая	67	86	59	97
Вторая	98	59	89	65

Примечание: площадь поверхности тела стандартная — 1,73 м².

60 мл/мин./1,73 м², то есть приведенная к стандартной поверхности тела, служит основанием для диагноза ХЗП у взрослых. СКФ рассчитывает врач с точностью определения до 1 мл/мин.

В настоящее время вариабельность результатов определения сывороточного креатинина затрагивает все уравнения для оценки СКФ, что приводит к получению менее точных результатов в диапазоне нормальной и слегка повышенной концентрации сывороточного креатинина (менее 133 мкмоль/л) [10]. При высоких концентрациях креатинина у пациентов с ХЗП расчетные методы более надежные и могут использоваться для определения дозы и срока введения лекарственных препаратов.

Все расчетные формулы основаны на измерении креатинина кинетическим методом по Яффе. При определении концентрации креатинина ферментативными методами результаты измерения будут более надежными, но и более низкими, что приводит к изменению расчетной СКФ, поэтому в бланке анализа важно указывать метод определения креатинина.

Многие рутинные автоматизированные методы определения сывороточного креатинина имеют предельно допустимую или выше допустимой погрешности измерения. Одним из способов уменьшения систематической погрешности и повышения правильности результатов исследования является использование калибраторов с определением концентрации креатинина дефинитивным методом с обязательной проверкой результатов по внешней оценке качества.

Источники вариабельности расчетной СКФ включают базовую биологическую вариацию, биологическую вариацию значений сывороточного креатинина, ошибки измерения сывороточного креатинина и ошибки, связанные с оценочным уравнением. СКФ может варьировать в зависимости от питания, физической активности, позы, изменений давления крови и других причин [1, 10]. При беременности, ожирении и дефиците массы тела (ИМТ более 40 и менее 15 кг/м²), вегетарианстве, миодистрофии, пара- и квадриплегии, ампутации конечностей, трансплантации почки в качестве меры СКФ предпочтительны клиренсовые методы [1].

При получении результатов, измеренных разными методами, может возникнуть клиническая ситуация, при которой оценка СКФ будет неоднозначной или не позволяющей делать клинические выводы (табл. 3).

Референтные значения СКФ для женщин: 90–130 мл/мин. У первой пациентки СКФ, рассчитанная на основании более высокого уровня креатинина, определенного

по методу Яффе, ниже СКФ, рассчитанной на основании более низкого содержания креатинина, измеренного кинетическим методом, и ниже референтного предела. Несмотря на то что оба показателя различаются между собой, с клинической точки зрения они не указывают на наличие ХЗП, ибо больше критического значения 60 мл/мин.

У второй пациентки СКФ, рассчитанная по уровню креатинина крови, измеренного методом Яффе, также ниже СКФ, измеренной ферментативным методом. Оба результата СКФ меньше нижнего референтного предела и различаются между собой. СКФ, основанная на определении креатинина методом Яффе, ниже критического значения 60 мл/мин., что указывает на возможность ХЗП. СКФ, основанная на определении креатинина кинетическим методом, выше критического значения 60 мл/мин., поэтому не может использоваться в качестве критерия для диагностики ХЗП. С учетом возможных объективных погрешностей измерения интерпретация результатов второй пациентки нуждается в уточнении путем определения клиренса по эндогенному креатинину, который проводится в лаборатории.

Определение клиренса по эндогенному креатинину

Клиренс (C) или коэффициент очищения — это количество миллилитров плазмы крови, которое очистилось от определяемого вещества за минуту.

Если вещество не реабсорбируется и не секретируется в канальцах, а только фильтруется, клиренс является мерой скорости клубочковой фильтрации. При наличии реабсорбции в канальцах клиренс будет меньше СКФ, а при наличии секреции — больше СКФ.

Клиренс по эндогенному креатинину основан на измерении уровня креатинина в сыворотке или плазме крови и моче. В почках креатинин фильтруется, не реабсорбируется и при нормальной концентрации практически не секретируется. Секреция растет при высокой концентрации креатинина крови и степени секреции и контролю не поддается.

Референтные пределы составляют 90–130 мл/мин.

Определение клиренса проводится для потенциальных доноров почки для выявления ХЗП и оценки функции каждой почки отдельно, которая может использоваться в специализированных стационарах. Определение проводится по креатинину крови и мочи из каждой почки отдельно и сравнивается с половиной референтных значений.

Клиренс рассчитывается на стандартную поверхность тела 1,73 м². Площадь поверхности тела (Sm²) можно определить по номограмме, зная рост и массу пациента. Точ-

ка пересечения отрезка на номограмме, соединяющего показатели роста в см и массы в кг со средней шкалой, показывает площадь поверхности тела пациента.

Площадь поверхности тела можно рассчитать по эмпирическим формулам. Расчет клиренса с учетом площади поверхности тела снимает ограничения по полу и возрасту.

Для расчета клиренса необходимо определить концентрацию креатинина крови и мочи, знать объем мочи в миллилитрах и время сбора мочи в минутах. Стандартное время сбора мочи — 24 часа. Допускается сбор мочи за 10–12 часов. Сбор мочи за 2 часа не информативен, так как объем мочи, собранной за 2 часа, зависит от питьевого и пищевого рациона и может значительно варьировать.

Формула расчета клиренса по эндогенному креатинину:

$$C = [U/P] \times V \text{ (мл/мин.)} \times [1,73 \text{ м}^2 / S \text{ м}^2],$$

где C — клиренс, U — концентрация креатинина в моче, P — концентрация креатинина в плазме или сыворотке крови, V — минутный диурез (объем мочи [мл] / время сбора мочи [мин.]), $1,73 \text{ м}^2$ — стандартная площадь поверхности тела, $S \text{ м}^2$ — площадь поверхности тела пациента. При расчете единицы измерения креатинина крови и мочи должны быть одинаковые. Округление — до 1 мл (табл. 4).

Расчет клиренса креатинина имеет свои преимущества и недостатки (табл. 5).

Заключение

Снижение СКФ является одним из наиболее ранних признаков ХЗП. При снижении СКФ наблюдается повышение концентрации креатинина, часто не выходящее за референтные пределы. Достоверное повышение концентрации креатинина может быть определено по сравнению с критической разницей RCV%, которая для креатинина составляет 15 % и является основанием для расчета СКФ или определения клиренса по эндогенному креатинину.

Современные формулы расчета СКФ основаны на определении креатинина крови кинетическим методом по Яффе. Использование ферментативных методов показывает более низкие значения креатинина, которые изменяют значения СКФ и вызывают дополнительные трудности в интерпретации результатов. Расчетные методы СКФ наиболее эффективны при высоких значениях креатинина крови и при определении дозы и сроков введения ряда лекарственных препаратов.

Таблица 4
Пример расчета клиренса по эндогенному креатинину

Параметр	Значение
Креатинин крови	100 мкмоль/л
Креатинин мочи	6000 мкмоль/л
Диурез	900 мл
Время сбора мочи	10 ч (600 мин.)
Рост	170 см
Масса	100 кг
Поверхность тела (по номограмме)	$1,92 \text{ м}^2$
Расчет: $V = 900 \text{ (мл)} / 600 \text{ (мин.)} = 1,5 \text{ (мл/мин.)}$ $C = (6000 / 100) \times 1,5 \times (1,73 / 1,92) = 81 \text{ (мл/мин.)}$ Референтные значения: 90–130 мл/мин. Оценка результата: клиренс снижен	

При получении неоднозначных результатов, которые могут наблюдаться при нормальных или слегка повышенных концентрациях креатинина, рекомендуется определение клиренса по эндогенному креатинину.

Результаты клиренса по эндогенному креатинину не зависят от метода исследования при условии измерения концентрации креатинина крови и мочи одним и тем же методом и рекомендуются для пациентов с нормальным уровнем креатинина крови, получении неопределенных результатов расчетной СКФ, при нестандартной доле мышечной массы в организме пациента.

Список литературы

1. Алгоритм специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова. Сахарный диабет. 2017; 20 (1S): 1–112. DOI: 10.14341/DM20171S8, 2017.
2. Зильва Дж. Ф., Пэннел П. Р. Клиническая химия в диагностике и лечении, М, Медицина, 1988.
3. Маршалл В. Дж. Клиническая биохимия. М., Бином, 1999.
4. Grubb AO. Cystatin C-properties and use as diagnostic marker. Adv Clin Chem 2000; 35: 63–99.
5. DiMaggio EP, Corle D, O'Brien JF e.c. Effect of long-term freezer storage, thawing, and refreezing on selected constituents of serum. Mayo Clin Proc. 1989; 64: 1226–34.
6. Kubasik NP, Lisuzzo CW, Same DG e.c. Multilayered film analysis: evaluation of ammonia and creatinine slides. Clin Biochem 1984; 17: 15–8.
7. Laterza O, Price C, Scott M. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? Clin Chem 2002; 48: 699–707.
8. Levey AS. Measurement of renal function in chronic renal disease. Kidney Int 1990; 38: 167–84.
9. Myers G.L., Miller W.G., Coresh J. e.c. Рекомендации по улучшению процедуры измерения сывороточного креатинина: отчет лабораторной рабочей группы Национальной образовательной программы по заболеваниям почки, Clinical Chemistry 52: 1, 5–18 (2006).
10. Spencer K. Analytical reviews in clinical biochemistry: the estimation of creatinine. Ann Clin Biochem 1986; 23: 1–25.
11. westgard.com/biodatabase1.htm.

Таблица 5
Основные преимущества и недостатки клиренса по эндогенному креатинину

Преимущества	Недостатки
Возможность персонального подхода к пациенту (определение креатинина в крови и моче)	Более трудоемкий метод для пациента и лаборатории
Независимость от метода исследования (одинаковые методы определения в крови и моче) Результаты зависят от правильности сбора и измерения объема мочи	
Высокая информативность результата при уровне креатинина не выше 130 мкмоль/л	При высоком уровне креатинина результаты завышены из-за неконтролируемого повышения секреции

Для цитирования. Волкова И. А., Савина М. И. Особенности методов оценки скорости клубочковой фильтрации // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 43–47.



В. В. Вельков

Сепсис и острое повреждение почек — дорога с двухсторонним движением: значения биомаркеров

Часть II

В. В. Вельков, к.б.н., директор по науке

АО «ДИАКОН», г. Пушкино, Московская область

Sepsis and acute kidney injury as two-way street: values of biomarkers

V. V. Velkov

DIAKON Co., Pushchino, Moscow Region, Russia

Резюме

Краткий обзор, посвященный септическому острому повреждению почек (С-ОПП), синдрому, одновременно соответствующему критериям сепсиса и ОПП. Согласно статистике, у 30–50 % критических пациентов диагностируется или сепсис, или ОПП, при этом сепсис стимулирует развитие ОПП, а развитие ОПП — сепсис. Морбидность и летальность при С-ОПП выше, чем при сепсисе и ОПП по отдельности. Основные патофизиологические механизмы: а) развития ОПП при сепсисе: поступающая в почки «токсичная септическая» кровь содержит большое количество провоспалительных факторов, что повреждает канальцы и приводит к тубулярной дисфункции; б) развития сепсиса при ОПП: ОПП повреждает дистальные органы, а уремия — функции иммунной системы, что провоцирует развитие сепсиса. Для ранней диагностики и мониторинга С-ОПП должны проводиться параллельное измерение и мониторинг маркеров сепсиса и ренальной дисфункции. Однако, как показывают многочисленные данные, наличие ОПП приводит к неинфекционному повышению маркеров сепсиса, а наличие сепсиса повышает маркеры ОПП независимо от ренальной дисфункции. В целом при сепсисе ОПП и С-ОПП ренальные маркеры одновременно отражают как тяжесть ренальной дисфункции, так и тяжесть воспаления, а маркеры сепсиса — как тяжесть сепсиса, так и тяжесть ренальной дисфункции. Для определения пограничных уровней септических маркеров, применяемых для диагностики С-ОПП, необходимы рекомендации по повышению их значений в зависимости от степени тяжести ренальной дисфункции у критических пациентов.

Ключевые слова: сепсис, острое повреждение почек, септическое острое повреждение почек, биомаркеры.

Summary

The brief review, dedicated to Septic Acute Injury (S-AKI) — the syndrome simultaneously corresponding to criteria of sepsis and acute kidney injury. Sepsis or AKI are diagnosed 30–50 % of critical patients. Sepsis is promoting the developing of AKI and AKI is promoting the development of sepsis. Morbidity and lethality in S-AKI is higher than that is sepsis and in AKI separately. The main mechanisms of the development of: a) AKI in sepsis — the toxic septic blood containing huge amounts of proinflammatory factors damage the renal tubules resulting tubular dysfunction; b) sepsis in AKI — uremia is damaging distal organs and functions of immune systems which provoke sepsis development. For early diagnostics of S-AKI in patients admitting in critical care units the simultaneous measurements and monitoring of sepsis and kidney biomarkers are to be made. The problems of such measurements is that AKI decreases the clearance of septic markers and their levels are increasing in noninfectious conditions. From the other hand in septic conditions inflammation can increase the levels of renal markers independently of renal pathologies. In general in sepsis, AKI and in S-AKI the increased levels of sepsis markers reflect simultaneously severity of infectious inflammation and of renal dysfunction, and kidney markers reflect simultaneously severity of renal dysfunction and of infectious inflammation. The correction of cut-off values of septic markers used for S-AKI diagnostics must be based on the degree of severity of renal dysfunction in critical patients.

Key words: sepsis, acute kidney injury, septic acute kidney injury, biomarkers.

Влияет ли ОПП на диагностические характеристики маркеров сепсиса: СРБ

Что отражает СРБ: тяжесть воспаления или тяжесть ОПП? Развитие системного воспаления играет ключевую роль в развитии ОПП, а СРБ — в развитии воспаления [83–85]. Еще в 2003 году было показано, что когда СРБ повышается, ренальная функция снижается, и это ведет к ХБП. А если СРБ повышается сильнее, наступает ТСРЗ [83]. СРБ — маркер воспаления, широко применяемый в ОРИТ. Его повышение отражает воспаление как связанное с инфекциями, так и «стерильное». В высокочувствительном (ВЧ) диа-

пазоне измерений (от 0,05 до 10 мг/л) СРБ отражает так называемый вялотекущий воспалительный процесс, протекающий, например, в стенках коронарных сосудов и связанный с развитием атеросклероза. При этом вЧСРБ является предиктором острых коронарных событий у практически здоровых лиц. В острофазном диапазоне (от 10 мг/л) СРБ отражает тяжесть системного воспаления при различных патологических процессах, в частности при сепсисе [86].

СРБ пентамерный → СРБ мономерный. СРБ может находиться в двух изоформах (конформациях): пентамерной — п-СРБ (из пяти одинаковых субъединиц) и мономерной (из одной субъединицы) — м-СРБ.

Пентамерный СРБ. При начале воспаления синтез СРБ индуцируют провоспалительные цитокины, в основном ИЛ-6 и в меньшей степени интерлейкин 1β (IL-1β) и ФНО-α. п-СРБ синтезируется преимущественно в гепатоцитах, откуда секретируется в циркуляцию. Также п-СРБ синтезируется в гладкомышечных клетках, макрофагах, лимфоцитах, в клетках нейронов, в респираторном эпителии, эндотелии, в адипоцитах и эпителиальных клетках почечных канальцев. Сначала в эндоплазматическом ретикулуме клеток этих типов синтезируются мономеры, которые затем ассоциируют в пентамеры. При отсутствии воспаления п-СРБ конститутивно

и медленно секретируется из эндоплазматического ретикула в циркуляцию; при развитии системного воспаления синтез и секреция идут быстро. При воспалении уровни п-СРБ, составляющие у здоровых лиц менее 1 мг/л, за 24–72 часа могут возрасти в тысячу раз. Катаболизируется п-СРБ в гепатоцитах, время полужизни в крови — 19–24 часа вне зависимости от тяжести воспаления и уровней в циркуляции [87–89].

Функции п-СРБ — противовоспалительные. Исходно п-СРБ имеет противовоспалительные активности, направленные на распознавание и удаление инфицирующих агентов (индукция фагоцитоза, активация комплимента по классическому пути, стимулирование апоптоза и др.). После узнавания лигандов (РАМР или DAMP) п-СРБ необратимо диссоциирует в м-СРБ. Это ведет к переходу противовоспалительной формы п-СРБ в провоспалительную м-СРБ. Происходит это в некротизированных и ишемических клетках, в апоптотных клетках, на мембранах активированных клеток (тромбоцитов, моноцитов и эндотелиальных клеток).

Функции м-СРБ — провоспалительные. Диссоциация СРБ на мономеры приводит к амплификации (усилению) провоспалительных механизмов клетки и адресной локализации их действия в конкретных поврежденных тканях. Например, при атеросклерозе, при развитии ишемии и снижении реперфузии; при отторжении трансплантата м-СРБ стимулирует хемотаксис, привлекает циркулирующие лейкоциты в конкретные зоны воспаления и может задерживать апоптоз. При этом пентамерный и мономерный СРБ могут действовать в противоположных направлениях, ингибируя или индуцируя синтез NO соответственно [87]. В целом диссоциация пентамерного СРБ в мономерный усиливает воспаление и адресно локализует его в патологически измененных тканях [88, 89].

Применяемые сейчас тесты на СРБ не отличают противовоспалительный п-СРБ от провоспалительного м-СРБ. Использование тестов, специфически измеряющих уровни как п-СРБ, так и м-СРБ, обещает привести к новым открытиям и новым диагностическим

возможностям. Первое сообщение о разработке коммерческого ИФА теста на м-СРБ уже появилось [90].

При воспалении высокий СРБ приводит к ренальной патологии, и почки начинают сами синтезировать м-СРБ. Еще ранние исследования показали, что высокие уровни СРБ, исходно повышенные по причинам, не связанным с ренальной патологией, стимулируют воспаление в почках. Так, у трансгенных мышей, синтезирующих повышенные уровни СРБ, тяжесть экспериментальной ренальной патологии была выше, чем у мышей, не имевших высокого СРБ. Более того, у мышей, сверхсинтезирующих СРБ, ренальное воспаление было более тяжелым и характеризовалось значительным повышением количества *тубуло-интерстициальных* Т-клеток и макрофагов, содержащих повышенные количества провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул адгезии. В целом у таких мышей во всех типах ренальных клеток, особенно в эпителиальных клетках канальцев, повышенные уровни СРБ были связаны с ранним развитием обструктивной нефропатии, воспалением и фиброзом. И более того, у таких мышей, в отличие от нормальных, в почках обнаруживался СРБ. Авторы заключили, что «СРБ является медиатором ренального воспаления и фиброза» [91]. Впоследствии этому было получено серьезное подтверждение. Известно, что ишемическое нарушение ренальной реперфузии (ИНРР) — частая причина ОПП, развивающегося при гипотензии, после кардиохирургии и неизбежное при трансплантациях почки. Показано, что у трансгенных мышей, уже имевших экспериментальное билатеральное ИНРР, искусственное повышение СРБ обостряло ИНРР [92]. Далее оказалось, что после того как повышенный СРБ вызывает повреждение почек, они начинают синтезировать его сами. При использовании *in vitro* культуры ренальных тубулярных эпителиальных клеток было обнаружено, что после стимуляции ИЛ-6 они начинают секретировать СРБ (показано с помощью ПЦР, моноклональных антител и иммуногистохимии). Аналогичные результаты были получены и *in vivo* с применением образцов ренальных трансплантатов, которые подверглись острому отторжению [93].

ОПП: именно м-СРБ повреждает канальцы. Как оказалось, ренальный синтез м-СРБ обостряет ОПП из-за того, что м-СРБ ингибирует регенерацию некротизированных *тубулярных* эпителиальных клеток. При этом м-СРБ непосредственно взаимодействует с тубулярными эпителиальными клетками и повреждает их [94]. При исследовании биопсии диабетических пациентов с применением иммуногистохимии и антител, связывающихся преимущественно с м-СРБ, было показано, что интенсивность специфического для м-СРБ сигнала окрашивания обнаруживается в цитоплазме канальцев, но не в клубочках, сосудах и интерстиции. В нормальных ренальных тканях м-СРБ не определялся. Связи между уровнями канальцевой мРНК, кодирующей м-СРБ, и протеинурией обнаружено не было. В целом была показана связь между интенсивностью иммуногистохимического сигнала, специфического для м-СРБ, снижением ренальной функции и возрастающей тяжестью тубулярных повреждений [95].

Таким образом, повышение СРБ — один из механизмов инициации и утяжеления ОПП. Какое значение может иметь измерение СРБ при ОПП и при С-ОПП? Какая доля такого повышения СРБ будет отражать тяжесть сепсиса, а какая, синтезируемая в почках, — тяжесть ОПП? Ответа пока нет. Но в любом случае чем выше СРБ, тем тяжелее С-ОПП, тем хуже прогноз.

Как ОПП влияет на диагностические характеристики ПКТ?

Чем тяжелее ХБП, тем выше ПКТ. ПКТ — самый широко применяемый маркер для диагностики и мониторинга сепсиса [96]. Однако еще в ранних исследованиях было замечено, что у пациентов с начальными стадиями ХБП уровни ПКТ повышаются при отсутствии инфекции. Было высказано предположение, что причина этого — или падение клиренса ПКТ из-за ренальной дисфункции, или повышение продукции из-за уремии, активирующей синтез провоспалительных цитокинов, а затем и ПКТ [97]. Позднее было показано, что у несептических пациентов с уремией, назначаемых

Таблица 14
Чувствительность и специфичность пограничных уровней ПКТ
для диагностики сепсиса при ХБП [100]

Пограничный уровень (нг/мл)	Чувствительность	Специфичность
Выше 0,5	0,68 (0,31–0,91)	0,94 (0,78–0,99)
Ниже 0,5	0,53 (0,39–0,66)	0,91 (0,84–0,95)
Равен 0,5	0,62 (0,48–0,99)	0,94 (0,84–0,95)
Перитонеальный диализ	0,53 (0,39–0,66)	0,91 (0,84–0,95)

Таблица 15
Уровни ПКТ (пг/мл) и СРБ при (мг/л) при ХБП 1–4-й стадии [101]

	Без инфекции	Локальная инфекция	Сепсис
ПКТ	0,060 (0,027; 0,127)	0,077 (0,049; 0,206)	4,280 (3,280; 9,010)
СРБ	7,0 (4,9; 7,2)	15,4 (6,7; 49,5)	150,6 (42,8; 185,3)

Таблица 16
Уровни ПКТ (нг/мл) и СРБ (мг/л) при ХБП 5-й стадии [101]

	Без инфекции	Локальная инфекция	Сепсис
ПКТ	0,13 (0,64; 0,571)	0,652 (0,317; 1,70)	6,290 (1,745; 32,653)
СРБ	6,8 (4,0; 8,0)	27,0 (7,7; 75,0)	46,1 (9,0; 171,0)

Таблица 17
Уровни СРБ и ПКТ (нг/мл) при снижении СКФ (мл/мин./1,73 м²) у неинфицированных
и инфицированных пациентов [102]

	СРБ, мг/дл		ПКТ, нг/мл	
	Без инфекции	С инфекцией	Без инфекции	С инфекцией
СКФ ≥60	2,38 (8,46)	8,42 (10,82)	0,05 (0,13)	0,45 (4,21)
СКФ <60	0,83 (2,48)	12,08 (20,02)	0,25 (0,53)	4,76 (32,37)
СКФ ≥90	2,38 (5,36)	6,09 (10,36)	0,05 (0,10)	0,21 (1,98)
60 ≤ СКФ < 90	2,55 (11,45)	11,06 (16,52)	0,07 (0,20)	1,28 (20,37)
30 ≤ СКФ < 60	0,96 (2,37)	12,19 (16,46)	0,09 (0,22)	2,88 (19,80)
15 ≤ СКФ < 30	0,75 (2,28)	19,86 (21,69)	0,17 (0,42)	3,22 (77,22)
Без РЗТ*	0,62 (2,65)	18,82 (16,54)	0,25 (0,53)	14,44 (65,76)
ГД*	1,89 (3,53)	10,19 (22,12)	0,55 (0,80)	7,37 (36,34)
ПД*	0,40 (1,33)	3,30 (9,78)	0,40 (0,45)	1,31 (10,74)

Примечание: * — РЗТ — ренальная заместительная терапия; ГД — гемодиализ, ПД — перитонеальный диализ. Уровни маркеров — медиана (интерквартильный диапазон).

на гемодиализ, время полужизни ПКТ при клиренсе креатинина более 87 мл/мин. составляло 28,9 часа, при клиренсе менее 30 мл/мин. — 33 часа, что, естественно, приводило к повышению уровней ПКТ [98]. Затем обнаружилось, что у пациентов с ХБП, не имевших инфекций, уровни ПКТ перед началом ренальной заместительной терапии составляли $1,82 \pm 0,39$ нг/мл против менее 0,1 нг/мл у здоровых лиц. В среднем 36% пациентов с ХБП

без инфекций имели ПКТ более 0,5 нг/мл, но 36–100% инфицированных пациентов также имели ПКТ выше 0,5 нг/мл [99].

В целом сравнение результатов различных исследований влияния тяжести ренальных патологий на уровни ПКТ у инфицированных и неинфицированных пациентов весьма затруднительно, поскольку различные авторы пользуются разными критериями тяжести ХБП и ОПП. Тем

не менее в 2013 году был опубликован мета-анализ семи исследований, включавших наблюдение 803 пациентов с ХПН; ПКТ был измерен у 803 лиц, СРБ — у 492. Анализ показал, что для диагностики сепсиса при ХБП обобщенные значения чувствительности ПКТ составляли 0,73 (0,54–0,86), специфичности — 0,88 (0,79–0,93); для СРБ — 0,78 (0,52–0,92) и 0,84 (0,52–0,96) соответственно, табл. 14.

Уровни ПКТ положительно коррелировали с повышением стадии ХБП, перитонеальным диализом, ССЗ и олигоурией. Авторы пришли к заключению, что «для диагностики бактериальных инфекций при ренальной недостаточности ПКТ — маркер, скорее, специфический, чем чувствительный» [100].

В дальнейшем предиктивные характеристики ПКТ изучались при наблюдении 541 пациента с ХБП разной степени тяжести (стадии 1–5) [101]. Все пациенты были разделены на две группы: имевшие ХБП стадий 1–4 и ХБП пятой стадии. Обе группы были разделены на три подгруппы: без инфекций, с локальной инфекцией и с сепсисом. Обнаружилось, что исходные уровни ПКТ в группах с ХБП 1–4-й стадии возрастали с повышением тяжести ренальной патологии. При этом ПКТ предсказывал сепсис с AUC ROC — 0,956, но не предсказывал наличие локальной инфекции, табл. 15.

В группе с пятой стадией ХБП локальную инфекцию предсказывали и ПКТ (AUC ROC — 0,715), и СРБ (AUC ROC — 0,780). Сепсис в этой группе предсказывал только ПКТ (AUC ROC — 0,823), но не СРБ, табл. 16.

СКФ снижается — ПКТ повышается. В специальном исследовании наблюдались 493 пациента. Было обнаружено, что со снижением СКФ уровни СРБ и ПКТ повышаются при отсутствии инфекции, табл. 17.

У неинфицированных пациентов уровни СРБ не коррелировали с СКФ, но при инфекции зависели от того, была ли инфекция локальной и был ли сепсис тяжелым. Наилучший пограничный уровень СРБ для выявления инфекции у пациентов с ренальными нарушениями (при СКФ менее 60 мл/мин./1,72 м²) составлял 3,08 мг/дл,

для ПКТ — 1,1 нг/мл. Для пациентов с нормальной почечной функцией лучший пограничный уровень для диагностики инфекции у СРБ был 2,49 мг/дл, у ПКТ — 0,08 нг/мл [102].

В более позднем исследовании наблюдались 473 пациента, имевших СКФ менее 30 мл/мин./1,73 м². Подтвердилось, что при отсутствии инфекций снижение СКФ повышает ПКТ. Для выявления бактериемии у пациентов с ренальными патологиями были получены следующие диагностические характеристики ПКТ, табл. 18.

Авторы заключили, что «у пациентов с нарушенной ренальной функцией использование только одного пограничного уровня ПКТ не является надежным, чувствительным или специфическим предиктором бактериальной инфекции. Возможно, следует использовать два пограничных уровня: 1) 0,5 нг/мл, ниже которого инфекция маловероятна (чувствительность 0,80) и 2) 3,2 нг/мл, выше которого инфекция весьма вероятна (специфичность 0,75)» [103].

Весьма показательными оказались результаты наблюдения пациентов с ТСРЗ и бактериальной инфекцией, находившихся на антибиотикотерапии (группа и-ТСРЗ; n = 21), и пациентов на гемодиализе, не имевших признаков инфекций (контрольная группа к-ТСРЗ, n = 20). Уровни ПКТ составляли: при и-ТСРЗ — 2,95 ± 3,67 нг/мл против 0,50 ± 0,49 при к-ТСРЗ. Однако при этом концентрации ПКТ с тяжестью инфекции не коррелировали, табл. 19.

Авторы сделали вывод, что «при ТСРЗ оптимальным пограничным уровнем ПКТ для выявления сепсиса является 0,75 нг/мл, а не используемый ныне 0,5 нг/мл. При cut-off 0,75 нг/мл чувствительность для диагностики инфекции составляла 76,2%, специфичность — 80,0%; для диагностики ССВО: чувствительность — 100 %, специфичность — 60,6». И в целом «пограничный уровень s-ПКТ, составляющий 0,75 нг/мл, является подходящим индикатором инфекции у пациентов с ТСРЗ» [104].

Чем выше тяжесть ОПП, тем выше пограничный уровень ПКТ для диагностики сепсиса. В специальном

Таблица 18
Пограничные уровни ПКТ для диагностики бактериемии при СКФ менее 30 мл/мин./1,73 м² [103]

Пограничный уровень (нг/мл)	Чувствительность	Специфичность
0,5	0,89	0,35
1,5	0,79	0,59
2,0	0,73	0,65
3,2	0,70	0,75

Таблица 19
Уровни ПКТ (нг/мл) и СРБ (мг/дл) при ТСРЗ [104]

	к-ТСРЗ	и-ТСРЗ
ПКТ	0,50 ± 0,49	2,95 ± 3,67
СРБ	0,32 ± 0,51	10,89 ± 8,66
Креатинин, мг/дл	10,60 ± 2,00	6,40 ± 3,60

исследовании 393 критических пациента были разделены на группы без ОПП и с ОПП. Тяжесть ОПП определялась согласно критериям RIFLE (Risk, Injury, Failure). Затем пациенты каждой группы были классифицированы как септические и несептические. ПКТ измеряли при поступлении. Самые высокие уровни ПКТ были при С-ОПП, табл. 20.

Значения AUC ROC для выявления сепсиса при указанных пограничных уровнях ПКТ составляли: без ОПП — 0,958; в группе R — 0,888; I — 0,917; F — 0,857 [105].

Позднее в аналогичном исследовании наблюдался 91 критический пациент, имевший по крайней мере один признак ССВО. Наличие ОПП диагностировали согласно пограничным уровням бимаркеров: sNGAL ≥ 150 нг/мл; s-цистатина C ≥ 0,98 мг/л и значения СКФ < 60 мл/мин (креатинин). Показано: уровни ПКТ возрастают как у пациентов без ОПП, так и у пациентов с ОПП и инфекцией, табл. 21.

Авторы заключили, что для «диагностики сепсиса при ОПП с помощью ПКТ необходимо использовать различные пограничные уровни в зависимости от того, с помощью какого маркера диагностируется ОПП» [106].

Высокий ПКТ при поступлении — предиктор ОПП. В специальном исследовании наблюдался 1361 пациент, поступивший с симптомами инфекций. Через три дня количество случаев

ОПП составило 14,6%. Высокий ПКТ при поступлении оказался связанным с развитием ОПП, табл. 22.

В целом чем выше ПКТ при поступлении, тем выше риск развития ОПП. При этом высокие исходные уровни ПКТ коррелировали с высокими сывороточной мочевиной, креатинином и цистатином С. У пациентов с признаками инфекции при пограничном уровне 1,575 нг/мл ПКТ имел самую высокую предиктивную способность по отношению к развитию ОПП, чувствительность составляла 61,7%, специфичность — 84,6%. Авторы заключили: «у пациентов с симптомами инфекций ПКТ при поступлении может использоваться как предиктивный маркер развития ОПП, индуцируемого сепсисом» [107].

Недавнее исследование подтвердило это положение. У 201 пациента, при поступлении в ОРИТ не имевшего ни ХБП, ни ОПП, измерялся ПКТ. Через семь дней количество случаев развившегося ОПП составило 36,8%. Показано, что ПКТ выше 10 нг/мл — предиктор развития ОПП у несептических пациентов, ОР — 4,430 (1,464–13,399), но он не является независимым предиктором развития ОПП у септических пациентов. Авторы заключили: «ПКТ, повышенный при поступлении несептических пациентов, выявляет лиц с повышенным риском развития ОПП» [108].

Таблица 20
Оптимальные значения cut-off ПКТ для диагностики сепсиса при ОПП разной тяжести [105]

ОПП, тяжесть	ПКТ, нг/мл	Чувствительность, %	Специфичность, %
Без ОПП	0,28	90,0	88,7
Стадия Risk	0,42	95,0	64,8
Стадия Injury	0,57	96,4	77,2
Стадия Failure	7,13 (!)	65,6	91,7

Таблица 21
Пограничные уровни ПКТ для диагностики сепсиса при ОПП, диагностируемой с помощью NGAL, цистатина С и СКФ [106]

		AUC	ПКТ, нг/мл	Чувствительность	Специфичность
Критерий ОПП					
NGAL	Без ОПП	0,67	0,85	0,68	0,58
	ОПП	0,72	2,01	0,57	0,81
Цис С	Без ОПП	0,67	0,85	0,42	0,83
	ОПП	0,82	0,94	0,69	0,79
СКФ	Без ОПП	0,69	0,86	0,45	0,85
	ОПП	0,81	1,14	0,69	0,79

Таблица 22
Уровни ПКТ при поступлении в ОРИТ и риск развития ОПП [107]

ПКТ, нг/мл	Количество пациентов (n)	ОПП, n / %
Менее 0,5	882	47 / 5,3
0,5 < ПКТ ≤ 2	233	36 / 15,5
2 < ПКТ ≤ 10	132	37 / 28,0
ПКТ более 10	114	79 / 69,3

Таблица 24
Пограничные уровни ПСП (нг/мл) для диагностики сепсиса у пациентов с ОПП, диагностируемом с помощью NGAL, цистатина С и СКФ [106]

Критерий ОПП		AUC	ПСП	Чувствительность	Специфичность
NGAL	Без ОПП	0,75	694	0,69	0,81
	С ОПП	0,83	828	0,81	0,71
Цис С	Без ОПП	0,77	684	0,63	0,88
	С ОПП	0,85	891	0,83	0,69
СКФ	Без ОПП	0,79	694	0,66	0,87
	С ОПП	0,84	891	0,86	0,62

ПКТ — предиктор развития ОПП при остром панкреатите. У пациентов с острым панкреатитом уровни ПКТ весьма высокие и связаны с тяжестью патологии и ее исходами. Полагается, что это может быть вызвано транслокацией ЛПС или других компонентов бактерий из кишечни-

ка в циркуляцию [109]. В специальном исследовании наблюдались 305 пациентов, поступивших с острым панкреатитом. В течение трех дней ОПП было диагностировано у 17 % пациентов. Из них у 71 % пациентов тяжесть ОПП соответствовала уровню R, у 9 % — уровню I и у 10 % —

уровню F. В течение 28 дней 33 пациента выжили, 19 — скончались. По сравнению с пациентами без ОПП у лиц с ОПП уровни ПКТ были повышены в 100 (!) раз, уровни СРБ — в 2,0 раза, уровни ИЛ-6 — в 3,5 раза. Авторы полагают, что «у пациентов с острым панкреатитом ПКТ является предиктором развития ОПП, который также может применяться для динамического прогнозирования течения ОПП» [110].

ПКТ — предиктор развития ОПП при чрезкожном коронарном вмешательстве (ЧКВ). Контрастные вещества, применяемые для визуализации сосудов при ЧКВ, обладают нефротоксичностью, что часто приводит к индуцированному контрастным веществом ОПП (ИКВ-ОПП). В исследовании наблюдалось 814 пациентов, перенесших ОКС и неотложное ЧКВ, у 11,8 % из них развилось ИКВ-ОПП. Уровни ПКТ у таких пациентов составляли: с ИКВ-ОПП — 0,11 (0,056–0,495) нг/мл против 0,04 (0,020–0,078) без ИКВ-ОПП; уровни вЧСРБ — $8,8 \pm 3,3$ против $6,7 \pm 3,8$ мг/л соответственно. При пограничном уровне ПКТ 0,065 нг/мл значение AUC ROC для предсказания ИКВ-ОПП составляло 0,779 (0,730–0,828), чувствительность — 72 %; специфичность — 70 %. Авторы заключили, что «у пациентов с ОКС, назначаемых на неотложное ЧКВ, измерение ПКТ может идентифицировать лиц, имеющих высокий риск развития ИКВ-ОПП» [111].

ПКТ — предиктор ОПП при аортокоронарном шунтировании (АКШ). Результаты недавнего исследования, в котором наблюдались 122 пациента, перенесших АКШ и затем сепсис или септический шок, были опубликованы под названием «Прокальцитонин не может использоваться как маркер инфекции у кардиохирургических пациентов с острым повреждением почек». Оказалось, что у пациентов с креатинином выше 2 мг/дл уровни ПКТ (медиана) были сходными как у инфицированных пациентов, так и у неинфицированных. Только когда креатинин был ниже 2 мг/дл, уровни ПКТ у пациентов с инфекцией были выше, чем у неинфицированных. Авторы полагают, что «при ОПП

повышенные уровни креатинина выше 2 мг/дл „компрометируют“ диагностические значения ПКТ как биомаркера инфекции». Подчеркивается, что «хотя антибиотикотерапия, назначаемая кардиохирургическим пациентам и рекомендуемая при ПКТ $\geq 0,5$ нг/мл, является надежной и снижает послеоперационные затраты, такая антибиотикотерапия не должна проводиться при креатинине ≥ 2 мг/дл» [112].

В целом при ОПП уровни ПКТ повышаются без инфекции, как предполагается, из-за снижения клиренса. При отсутствии при поступлении признаков сепсиса повышенный ПКТ отражает риск развития ОПП. При С-ОПП ПКТ отражает суммарную тяжесть ОПП и сепсиса.

Как ренальные патологии влияют на диагностические характеристики пресепсина?

Пресепсин (ПСП) — маркер сепсиса, открытый в 2005 году. Это белок крови, который, повышаясь при бактериальных инфекциях и микозах, является индикатором активации моноцитов и последующего фагоцитоза. ПСП начинает повышаться через 30–60 минут после начала инфекции и за 2–3 дня до манифестации клинических признаков инфекционного воспаления. При поступлении с подозрением на сепсис уровни ПСП прогнозируют развитие ПОН и неблагоприятные исходы; при мониторинге ПСП быстро и надежно отражает изменение тяжести инфекционного процесса, что позволяет оперативно принимать обоснованные клинические решения [113–118].

СКФ снижается — ПСП повышается. В относительно раннем исследовании было отмечено, что у пациентов с ОПП уровни ПСП повышаются при отсутствии признаков инфекции [119]. В дальнейшем в специальном исследовании измерения ПСП проводили у 71 несеptического пациента с показателями СКФ (определенными согласно клиренсу инулина), которые составляли (мл/мин./1,73 м²): G1 = СКФ ≥ 90 ; G2 = 60–90; G3 = 30–60; G4 = 15–30; G5 ≥ 15 . Уровни ПСП (пг/мл, медиана) составляли: при G1 + G2–69,8

(60,8–85,9); при G3–107,0 (68,7–150,0); при G4–171,0 (117,0–200,0); при G5–251,0 (213,0–297,5); у пациентов на гемодиализе — 1 160,0 (1070,0–1 400,0). Авторы заключили, что при снижении СКФ и отсутствии инфекции уровни ПСП повышались в «несеptическом» диапазоне ниже 400 пг/мл, («септический» диапазон ПСП выше 500 пг/мл). Но у гемодиализных пациентов уровни ПСП повышались в септическом диапазоне до значений, характерных для сепсиса и септического шока» [120].

ПСП при ОПП: для диагностики сепсиса нужны более высокие пограничные уровни. В специальном исследовании наблюдалось 247 критических пациентов, которые были разделены на группы: без ОПП — 112, с ОПП (критерии RIFLE) со стадией R, n = 50; I, n = 36; F, n = 42 и Loss + ESKD, n = 7. У септических пациентов групп R и I уровни ПСП были выше, чем у септических пациентов без ОПП, однако у несеptических пациентов с тяжелой почечной недостаточностью (Failure) уровни ПСП были такими же, как у септических пациентов. Данные об уровнях ПСП у пациентов со стадиями Loss + ESKD см. в табл. 23.

Таблица 23
Уровни ПСП у несеptических и септических пациентов при ОПП стадиях Loss и ESKD [121]

Пациент	Сепсис	ПСП (пг/мл)
1	–	2457
2	–	2134
3	–	19633
4	+	20000
5	+	3424
6	+	2450
7	+	2632

Для диагностики сепсиса значения AUC ROC у ПСП были следующими: без ОПП — 0,784 (0,683–0,860), при ОПП стадий R, I и F — 0,698. При пограничном уровне 670 пг/мл чувствительность составляла 70,3 %, специфичность — 81,3 %, при уровне 864 пг/мл — 71,4 и 63,8 % соответственно. Авторы заключили, что «ПСП может быть надежным индикатором сепси-

са не только у пациентов без ОПП, но и у пациентов с умеренно тяжелыми стадиями ОПП, но не может быть надежным индикатором сепсиса у пациентов с последней стадией ОПП» [121].

В следующем исследовании наблюдался 91 пациент, поступивший с подозрением на сепсис, наличие ОПП диагностировали согласно пограничным уровням бимаркеров: sNGAL ≥ 150 нг/мл; s-цистатина C $\geq 0,98$ мг/л и значению СКФ < 60 мл/мин. (креатинин), табл. 24.

Авторы заключили, что «при ОПП повышение ПСП связано как с тяжестью инфекции, так и с тяжестью ренальной дисфункции, для диагностики сепсиса у пациентов без ОПП и с ОПП необходимы различные пограничные уровни ПСП» [106].

Приведет ли снижение тяжести ОПП к нормализации уровней ПСП?

После трансплантации почек повышенный ПСП снижается. Наблюдались восемь пациентов с TCR3, не имевших признаков инфекций и находившихся на диализе, которым была проведена трансплантация почек. До наложения анестезии уровни ПСП составляли 1252 ± 451 пг/мл, ПКТ — $0,58 \pm 0,74$ нг/мл. После операции ПСП в течение первых трех дней снизился до 250 ± 30 пг/мл, у ПКТ достоверного снижения не наблюдалось. Эти данные еще раз подтверждают, что ренальная функция играет важную роль в метаболизме ПСП [122].

Повышение ПСП при осложненном циррозе печени может быть связано с развитием ОПП. Обычно 25–35 % пациентов с циррозом печени поступают или уже с бактериальными инфекциями, или они развиваются после госпитализации. Это повышает риск развития сепсиса. Риск смерти таких пациентов в течение месяца достигает 30 %, а в течение года — 63 %. Смертность при септическом циррозе печени может достигать 70 % [123]. Из наблюдаемых 108 пациентов с исходно неосложненным циррозом печени 50,9 % имели компенсированный цирроз, 49,1 % — декомпенсированный. При поступлении медианное значение ПСП во всей популяции составляло

440,4 пг/мл. При декомпенсированном циррозе уровни ПСП составляли $599,100 \pm 492,599$ против $287,5 \pm 130,5$ пг/мл при компенсированном. При поступлении с осложненным циррозом уровни ПСП составляли $1438,0 \pm 1247,2$ против $725,3 \pm 602,8$ с неосложненным. Существенно, что у пациентов, имевших при поступлении весьма высокие уровни ПСП $1827,3 \pm 1118,8$ пг/мл, развилось ОПП. У пациентов без развития ОПП уровень ПСП был $1048,7 \pm 1302,1$. Авторы заключили, что «при поступлении с неосложненным циррозом уровни ПСП повышены, при развитии осложнений эти уровни еще более повышаются, и дальнейшее их возрастание было связано с развитием ОПП, все случаи которого были фатальными [124].

Заключение

1. У 30–50% критических пациентов диагностируется сепсис или ОПП. Развитие сепсиса стимулирует развитие ОПП, а развитие ОПП стимулирует развитие сепсиса.
2. Септическое ОПП (С-ОПП) — синдром, одновременно соответствующий критериям сепсиса и критериям ОПП. Морбидность и летальность при С-ОПП выше, чем при сепсисе или при ОПП по отдельности.
3. Ранняя комплексная диагностика С-ОПП у критических пациентов является крайне актуальной.
4. Основной патофизиологический механизм развития ОПП при сепсисе: поступающая в почки токсичная септическая кровь, содержащая большое количество провоспалительных факторов, повреждает преимущественно канальцы и приводит к тубулярной дисфункции.
5. Основной патофизиологический механизм развития сепсиса при ОПП: наличие ОПП приводит к повреждению дистальных органов, а уремия — к дисфункции иммунной системы, что провоцирует развитие сепсиса.
6. Для диагностики развития и мониторинга С-ОПП должны проводиться параллельное измерение и мониторинг маркеров сепсиса и ренальной дисфункции.

7. Наличие сепсиса влияет на стандартные диагностические характеристики маркеров ОПП.
8. Креатинин повышается через 24–48 часа после начала развития тяжелой ренальной дисфункции, что делает невозможной своевременную диагностику и мониторинг С-ОПП.
9. NGAL может находиться в крови в гомодимерной изоформе, синтезируемой в нейтрофилах и в других типах неренальных клеток. Он в большей степени является маркером воспаления, а не маркером ренальной дисфункции; его уровни при ОПП одновременно отражают как тяжесть воспаления, так и тяжесть ренального повреждения.
10. NGAL в моче преимущественно находится в мономерной изоформе, синтезируемой в почечных канальцах и его концентрация в моче отражает тубулярную дисфункцию. Однако при этом из инфильтровавшихся в почки макрофагов в мочу секретруется также и «нейтрофильный» гомодимерный NGAL, отражающий воспаление.
11. Гетерогенность молекул NGAL и практическая невозможность в данный момент специфически измерять мономерный uNGAL, секретруемый поврежденными канальцами, затрудняет использование этого маркера для диагностики ОПП в гетерогенной популяции критически больных пациентов.
12. Диагностические характеристики р-цистатина С и s-цистатина С подвержены влиянию сепсиса в меньшей мере, чем характеристики креатинина и NGAL. u-Цистатин С весьма эффективный маркер, выявляющий ранние стадии развития тубулопатии, особенно при сепсисе. Резко повышенные при сепсисе уровни цистатина С в моче могут свидетельствовать о раннем развитии тубулярной дисфункции еще до того, как диагноз ОПП может быть поставлен на основании критериев RIFLE и AKIN.
13. Согласно текущим представлениям, самая ранняя стадия развития С-ОПП — повреждение канальцев. Для диагностики и мониторинга С-ОПП рекомендуется использование маркеров тубулярной дисфункции.
14. Наличие ОПП влияет на стандартные диагностические характеристики маркеров сепсиса.
15. СРБ. Повышение СРБ — один из механизмов инициации и утяжеления ОПП. СРБ может находиться в пентамерной и мономерной изоформах. При системном воспалении канальцы сами начинают синтезировать мономерную форму СРБ, что повреждает их функцию. При сепсисе измерение СРБ отражает как тяжесть воспаления, так и риск развития ОПП. В данное время коммерческие тесты для специфического измерения мономерного СРБ отсутствуют.
16. ПКТ. Чем тяжелее ренальная дисфункция, тем выше уровни ПКТ у пациентов без сепсиса. Один из механизмов неинфекционного повышения ПКТ — снижение его клиренса при ренальных патологиях. При С-ОПП уровни ПКТ отражают как тяжесть сепсиса, так и тяжесть ренальной дисфункции.
17. Чем тяжелее ренальная дисфункция, тем более высокие пограничные уровни ПКТ должны применяться для диагностики сепсиса. При поступлении пациентов без признаков инфекций высокие уровни ПКТ — предиктор ОПП.
18. ПСП. Чем тяжелее ренальная дисфункция, тем выше уровни ПСП у пациентов без сепсиса. Один из механизмов неинфекционного повышения ПСП — снижение его клиренса при ренальных патологиях. При поступлении пациентов без признаков инфекций высокие уровни ПСП — предиктор ОПП.
19. Чем более тяжелая ренальная дисфункция, тем более высокие пограничные уровни ПСП должны применяться для диагностики сепсиса.

Выводы

Для определения пограничных уровней септических маркеров, предназначенных для диагностики септического острого повреждения почек, необходимы рекомендации по их повышению в зависимости от степени тяжести ренальной дисфункции.

Автор считает приятной обязанностью сердечно поблагодарить О. И. Резникову (АО «ДИАКОН») за большую помощь, оказанную при работе над текстом.

Список литературы

83. Stuveling EM, Hillege HL, Bakker SJ, et al. C-reactive protein is associated with renal function abnormalities in a non-diabetic population. *Kidney Int* 2003; 63: 654–661.
84. Pecoits-Filho R, Sylvestre LC, Stenvinkel P. Chronic kidney disease and inflammation in pediatric patients: from bench to playground. *Pediatr Nephrol* 2005; 20: 714–720.
85. Rabb H, Griffin MD, McKay DB, et al. Acute Dialysis Quality Initiative Consensus XIII Work Group: Inflammation in AKI: Current Understanding, Key Questions, and Knowledge Gaps. *J Am Soc Nephrol*. 2015.
86. Vashist SK, Venkatesh AG, Marion Schneider E et al. Bioanalytical advances in assays for C-reactive protein *Biotechnol Adv*. 2016; 34 (3): 272–90.
87. R. Thiele, I. J. Zeller, I. H. Bannasch, I. et al. Targeting C-Reactive Protein in Inflammatory Disease by Preventing Conformational Changes. *Mediators of Inflammation Volume 2015, Article ID 372432*.
88. Sproston NR and Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front. Immunol*. 2018 9: 754.
89. McFadyen JD, Kiefer J, Braig D, et al. Dissociation of C-Reactive Protein Localizes and Amplifies Inflammation: Evidence for a Direct Biological Role of C-Reactive Protein and Its Conformational Changes. *Front. Immunol*. 2018; 9: 1351.
90. Zhang L, Li HY, Li W, et al. An ELISA Assay for Quantifying Monomeric C-Reactive Protein in Plasma. *Front Immunol*. 2018, 12: 9: 511.
91. Li Zi, Chung AC, Zhou L, et al. C-reactive protein promotes acute renal inflammation and fibrosis in unilateral ureteral obstructive nephropathy in mice. *Lab Invest*. 2011; 91: 837–851.
92. Pegues MA, McCrory MA, Zarjou A, et al. C-reactive protein exacerbates renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Renal Physiol*. 2013, 304: F1358–F1365.
93. Jabs WJ, Lögering BA, Gerke P, et al. The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. *Eur J Immunol*. 2003; 33 (1): 152–61.
94. Lai W, Tang Y, Huang XR et al. C-reactive protein promotes acute kidney injury by impairing tubular epithelial cell regeneration via the CD32-smad3-p27 dependent inhibition of CDK2/cyclin E mechanism. *Kidney Int*. 2016 90 (3): 610–626.
95. Schwedler SB, Guderian F, Dammrich J et al. Tubular staining of modified C-reactive protein in diabetic chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 18: 2300–2307, 2003.
96. Gilbert DN. Role of Procalcitonin in the Management of Infected Patients in the Intensive Care. *Infect Dis Clin N Am* 31, 2017; 435–453.
97. Meisner M, Schmidt J, Hüttner H et al. The natural elimination rate of procalcitonin in patients with normal and impaired renal function. *Intensive Care Med*. 2000; 26 Suppl 2: 212–6.
98. Dahaba AA, Rehak PH, List WF. Procalcitonin and C-reactive protein plasma concentrations in nonseptic uremic patients undergoing hemodialysis. *Inten Care Med* 2003; 29: 579–83.
99. Contou D, d'Ythurbide G, Messika J et al. Description and predictive factors of infection in patients with chronic kidney disease admitted to the critical care unit *J infect*, 2014; 68 (2): 105–15.
100. Lu XL, Xiao ZH, Yang M et al. Diagnostic value of serum procalcitonin in patients with chronic renal insufficiency: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28: 122–129.
101. Sun Y, Jiang L, Shao X. Predictive value of procalcitonin for diagnosis of infections in patients with chronic kidney disease: a comparison with traditional inflammatory markers C-reactive protein, white blood cell count, and neutrophil percentage *Int Urol Nephrol*. 2017; 49 (12): 2205–2216.
102. Park JH, Kim DH, Jang HR et al. Clinical relevance of procalcitonin and C-reactive protein as infection markers in renal impairment: a cross-sectional study. *Critical Care* 2014 18: 640.
103. El-Sayed D, Grotts J, Golger WA, et al. Sensitivity and Specificity of Procalcitonin in Predicting Bacterial Infections in Patients With Renal Impairment. *Open Forum Infect Dis*. 2014; 21; 1 (2): ofu068.
104. Lee WS, Kang DW, Back JH et al. Cutoff value of serum procalcitonin as a diagnostic biomarker of infection in end-stage renal disease patients *Korean J Intern Med*. 2015; 30 (2): 198–204.
105. Nakamura Y, Murai A, Mizunuma M, et al. Potential use of procalcitonin as biomarker for bacterial sepsis in patients with or without acute kidney injury. *J Infect Chemother*. 2015; 21 (4): 257–63.
106. Takahashi G, Shibata S, Fukui Y et al. Diagnostic accuracy of procalcitonin and presepsin for infectious disease in patients with acute kidney injury. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 86 (2): 205–10.
107. Nie X, Wu B, He Y et al. Serum procalcitonin predicts development of acute kidney injury in patients with suspected infection. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51 (8): 1655–1661.
- Jehee R, Skinner DL, De Vasconcellos K et al., 108. Serum procalcitonin levels predict acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrology (Carlton)*, 2017 Oct 2.
109. Ammori BJ, Becker KL, Kite P, et al. Calcitonin precursors: early markers of gut barrier dysfunction in patients with acute pancreatitis. *Pancreas*. 2003; 27: 239–243.
110. Huang H-L, Nie X, Cai B, et al. Procalcitonin Levels Predict Acute Kidney Injury and Prognosis in Acute Pancreatitis: A Prospective Study. *PLoS ONE*, 2013 8 (12).
111. Kurtul A, Murat SN, Yarlioglu M et al., Procalcitonin as an Early Predictor of Contrast-Induced Acute Kidney Injury in Patients With Acute Coronary Syndromes Who Underwent Percutaneous Coronary Intervention *Angiology*, 2015, 1–7.
112. Heredia-Rodríguez M, Bustamante-Munguira J, Fierro I et al. Procalcitonin Cannot Be Used as a Biomarker of Infection in Heart-Surgery Patients with Acute Kidney Injury. *J Crit Care*. 2016; 33: 233–9.
113. Chenevier-Gobeaux C, Borderie D, Weiss N et al. Presepsin (sCD 14-ST), an innate immune response marker in sepsis. *Clin Chim Acta*. 2015; 450: 97–103.
114. Liu Y, Hou JH, Li Q, et al. Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Springerplus*. 2016; 5 (1): 2091.
115. Wu CC, Lan HM, Han ST et al. Comparison of diagnostic accuracy in sepsis between presepsin, procalcitonin, and C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis *Ann Intensive Care*. 2017; 6; 7 (1): 91.
116. Yang HS, Hur M, Yi A., et al. Prognostic value of presepsin in adult patients with sepsis: Systematic review and meta-analysis *PLoS One*. 2018; 13 (1): e0191486.
117. Bellos I, Fitrou G, Pergialiotis V et al. The diagnostic accuracy of presepsin in neonatal sepsis: a meta-analysis. *Eur J Pediatr*. 2018; 177 (5): 625–632.
118. www.presepsintets.ru, сайт в Интернете.
119. Shozushima T, Takahashi G, Matsumoto N, et al. Usefulness of presepsin (sCD 14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Chemother*. 2011; 17: 764–9.
120. Nagata T, Yasuda Y, Ando M, et al. (2015) Clinical Impact of Kidney Function on Presepsin Levels. *PLoS One*. 2015; 10 (6): e0129159.
121. Nakamura Y, Ishikura H, Nishida T et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in patients with or without acute kidney injury. *BMC Anesthesiology BMC Anesthesiol*. 2014; Oct 4; 14: 88 14: 88.
122. Saito J, Hashiba E, Kushikata T et al. Changes in presepsin concentrations in surgical patients with end-stage kidney disease undergoing living kidney transplantation: a pilot study. *J Anesth*. 2016; 30 (1): 174–7.
123. Jalan R, Fernandez J, Wiest R, et al. Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference. *J Hepatol* 2014 Jun; 60 (6): 1310–24.
124. Elefsinioti I, Tsakiris SA, Barla G et al., Presepsin levels in cirrhotic patients with bacterial infections and/or portal hypertension-related bleeding, presenting with or without acute kidney injury. *Annals of Gastroenterology*. 2018. 31, 1–9.

Для цитирования. Вельков В. В. Сепсис и острое повреждение почек — дорога с двухсторонним движением: значения биомаркеров. Часть II // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 48–55.

Сравнение современных количественных методов определения уровня D-димера, основанных на иммунотурбидиметрии

А. Н. Мамаев, д.м.н., зав. лабораторией
М. В. Пыхтеева, врач-лаборант
С. С. Терехов, врач-лаборант
А. В. Кудинов, к.б.н., врач-лаборант
Д. А. Трухина, врач-лаборант
Е. В. Григорьева, к.м.н., врач-лаборант
Н. Н. Ясаfoва, врач-гематолог

Лаборатория патологии гемостаза КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Барнаул

Comparison of modern quantitative methods for determining level of D-dimer based on immunoturbidimetry

A. N. Mamaev, M. V. Pykhteeva, S. S. Terekhov, A. V. Kudinov, D. A. Trukhina, E. V. Grigoryeva, N. N. Yasafova
 Regional Clinical Hospital, Barnaul, Russia

Резюме

Цель работы — сравнительный анализ результатов определения уровня D-димера новым отечественным реагентом на основе оригинальных моноклональных антител с результатами широко распространенных зарубежных диагностических аналогов. В исследование были включены образцы крови 80 пациентов. Из числа этих больных у 22 пациентов (27,5%) были диагностированы тромбозы вен нижних конечностей, у 28 пациентов (35,0%) каких-либо тромботических осложнений не обнаружено (группа сравнения). Кроме того, в исследование были включены 30 беременных женщин (37,5%) на разных сроках гестации. Несмотря на некоторые различия при определении уровня D-димера, современные количественные методы исследования уровня D-димера демонстрируют сопоставимость результатов исследования, что документируется высокими показателями корреляции. Новый диагностический набор «Тех-D-димер-авто», основанный на использовании оригинальных моноклональных антител, демонстрирует хорошую сопоставимость с импортными аналогами и пригоден для выявления тромбозов.

Ключевые слова: D-димер, тромбоз, флеботромбоз, ТЭЛА, показатели системы гемостаза.

Summary

The object of this paper is the comparative analysis of the results of determination of the D-dimer level with the new home-produced reagent on the basis of original monoclonal antibodies with the results of the widespread diagnostic analogues. The research study included blood samples of 80 patients. 22 of these patients (27.5%) were diagnosed venous thromboses of the lower limbs, 28 patients (35.0%) did not have any thrombotic complications (control group). Besides, the research included 30 pregnant women (37.5%) with different duration of gestation. Despite some distinctions when determining the D-dimer level, contemporary quantitative methods of the D-dimer level study demonstrate comparability of the research results which is documented by the high rates of correlation. The new diagnostic kit Tech-D-dimer-auto, based on the use of original monoclonal antibodies, demonstrates good comparability with analogues and is suitable for detection of thrombosis.

Key words: D-dimer, thrombosis, phlebothrombosis, PE, indicators of hemostatic system.

Согласно статистике, от тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА), развившейся на фоне венозного тромбоза, ежегодно погибает один человек из каждой тысячи населения планеты [1]. Почти 50% таких больных умирает в течение 30 минут от момента ее возникновения, но у многих пациентов с острым тромбозом клинические проявления не всегда выражены одинаково, а порой даже отсутствуют [2]. В этой связи весьма важно иметь в арсенале диагностических процедур ЛПУ надежные методы исследования, пригодные для обнаружения тромбообразования. Для этой цели наибольшее распространение в практической медицине получила методика определения D-димера — продукта деградации поперечно-сшитого фибрина плазмином. Определение уровня D-димера используется для исключения венозных тромбозов и тромбоемболий [3–6]. Нормальное его содержание в плазме позволяет с точностью до 90% отвергнуть предположение о наличии тромбоза у больных с низкой или средней клинической вероятностью [3, 4, 7].

Цель работы — сравнительный анализ результатов определения уровня D-димера новым отечественным реагентом на основе оригинальных моноклональных антител с результатами

известных зарубежных диагностических наборов, предназначенных для количественного определения данного анализата.

Материалы и методы

Объектом исследования являлась бедная тромбоцитами плазма (БТП), полученная из венозной крови. Кровь забирали из локтевой вены в пластиковую пробирку, содержащую раствор цитрата натрия 3,2% в соотношении 9:1. Стабилизированную кровь центрифугировали при 1200–1600 g в течение 15 минут, в результате получали БТП. Центрифугирование проводили непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы на исследование — сразу же после центрифугирования. Не выполняли анализ плазмы крови, имеющей сгустки, гемолиз и полученной более 2 часов назад [8].

В исследование были включены образцы крови 80 пациентов обоего пола в возрасте 18–45 лет, направленных для обследования в лабораторию патологии гемостаза КГБУЗ «Краевая клиническая больница» (г. Барнаул) на протяжении трех месяцев. В их числе, по данным дуплексного сканирования, у 22 пациентов (27,5%) были диагностированы тромбозы вен нижних конечностей. Давность тромбозов

у этих пациентов не превышала 2 месяцев. У 28 пациентов (35,0%), направленных к врачу-гематологу в краевую клинику поликлинику для консультирования, каких-либо тромботических осложнений не обнаружено (группа сравнения). Дополнительно в исследование были включены 30 беременных женщин (37,5%) на разных сроках гестации.

Сравнивали результаты определения следующих диагностических наборов реагентов для количественного определения D-димера: «Тех-D-димер-авто» (использованы оригинальные моноклональные антитела производства ООО фирма «Технология-Стандарт», Россия; диагностический набор № 1), Auto Red D-Dimer (производитель — Helena Biosciences, Великобритания; диагностический набор № 2); INNOVANCE D-dimer (производитель — Siemens, Германия; диагностический набор № 3). Измерение методами № 1 и № 2 проводилось на коагулометре Sysmex CA-1500 (Sysmex, Япония); для определения INNOVANCE D-dimer (метод № 3) был использован коагулометр BCS-XP (Siemens, Германия). Результаты, полученные при использовании последнего метода, далее представлены с пересчетом единиц измерения.

Статистическая обработка полученных данных была осуществлена с использованием компьютерных алгоритмов Microsoft Office Excel 2003 и Statistica 6.0. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для учета сопоставимости результатов определения разными диагностическими системами использовали ранговый коэффициент корреляции Спирмена (R).

Результаты

Данные, полученные при определении уровня D-димера в плазме крови в группе больных с венозными тромбозами, представлены на рис. 1. Как следует из этого рисунка, сравниваемые тест-системы демонстрировали увеличение уровня D-димера у больных с венозными тромбозами, однако выраженность увеличения уровня D-димера при исследовании набором реагентов № 2 была значимо ниже.

Результаты, полученные при определении уровня D-димера в плазме крови у беременных, представлены на рис. 2. Как следует из указанного рисунка, сравниваемые тест-системы демонстрировали увеличение уровня D-димера у беременных, однако выраженность увеличения уровня D-димера при исследовании набором реагентов № 3 была значимо выше, чем при исследовании этого показателя другими наборами.

В таблице представлена информация о сопоставимости результатов, получаемых наборами разных производителей.

Как видно из данной таблицы, несмотря на различия при определении исследуемого анализа у беременных и у больных с венозными тромбозами, при определении D-димера разными наборами были выявлены прямые сильные корреляционные связи с высокой степенью достоверности.

Выводы

1. Несмотря на некоторые различия при определении уровня D-димера, современные количественные методы исследования уровня D-димера демонстрируют

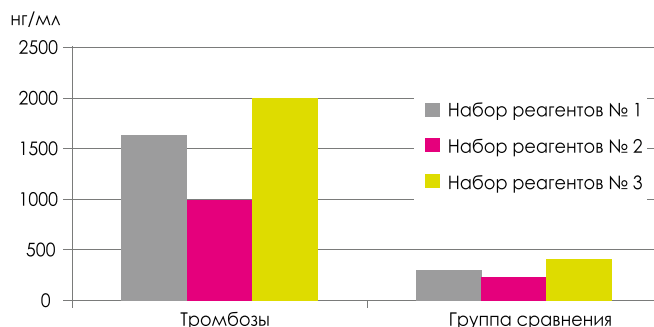


Рисунок 1. Результаты сравнительного исследования уровня D-димера в плазме крови разными диагностическими тест-системами у больных с тромбозами и в группе сравнения.

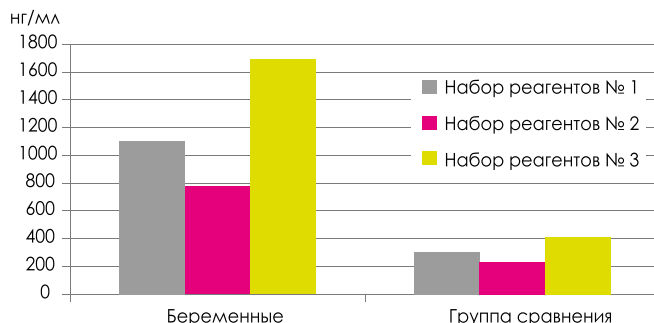


Рисунок 2. Результаты сравнительного исследования уровня D-димера в плазме крови разными диагностическими тест-системами у беременных.

Таблица
Показатели ранговой корреляционной зависимости (R) уровней D-димера при использовании различных тест-систем

Сравниваемые методы	Ранговый коэффициент корреляции Спирмена (R)	P
Набор реагентов № 1 — Набор реагентов № 2	0,89	$p < 0,001$
Набор реагентов № 1 — Набор реагентов № 3	0,88	$p < 0,001$
Набор реагентов № 2 — Набор реагентов № 3	0,96	$p < 0,001$

сопоставимость результатов исследования, что документируется высокими показателями корреляции.

2. Новый диагностический набор «Тех-D-димер-авто» (ООО фирмы «Технология-Стандарт», Россия), основанный на использовании оригинальных моноклональных антител, демонстрирует хорошую сопоставимость с импортными аналогами и пригоден для выявления тромбозов.

Список литературы

1. Thomas R. H. Hypercoagulability syndromes // Arch. Intern. Med. — 2001. — 12. — P. 2433–2439.
2. Бокарев И. Н. Попова Л. В. Современные проблемы тромбозов артерий и вен // Практическая медицина. — 2014. — Т. 82, № 6. — С. 13–17.
3. Мамаев А. Н. Практическая гемостазиология: (руководство для врачей) // М.: Практическая медицина, 2014. — С. 240.
4. Момот А. П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. — СПб.: Формат, 2006. — С. 208.
5. Causes of elevated D-dimer in patients admitted to a large urban emergency department. Lippi G., Bonfanti L., Saccenti C., Cervellini G. // Eur. J. Intern. Med. — 2014. — 25. — P. 45–48.
6. Magnitude of D-dimer matters for diagnosing pulmonary embolus. Shah K., Quas J., Rolston D. et al. // Am J. Emerg. Med. — 2013. — 31. — P. 942–945.
7. Levi M. Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation // Int. J. Lab. Hematol. — 2014. — 36. — P. 228–236.
8. Преаналитический этап исследования системы гемостаза. Мамаев А. Н., Гильманов А. Ж., Вавилова Т. В., Момот А. П. // Клиническая лабораторная диагностика. — 2011. — N4. — С. 35–38.

Для цитирования. Мамаев А. Н., Пыхтева М. В., Терехов С. С., Кудинов А. В., Трухина Д. А., Григорьева Е. В., Ясафова Н. Н. Сравнение современных количественных методов определения уровня D-димера, основанных на иммунотурбидиметрии // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 56–57.



Р.Г. Плавник

Экономическая эффективность внедрения ^{13}C -уреазного дыхательного теста на *Helicobacter pylori* в России

Р.Г. Плавник, к.м.н., зам. ген. директора по науке и внедрению

ООО «ИЗОКАРБ», г. Москва

*Economic efficiency of implementation of ^{13}C -urea breath test on *Helicobacter pylori* in Russia*

R.G. Plavnik

ISOCARB Co., Moscow, Russia

Резюме

В статье определены источники и представлен расчет реального и потенциального прямого экономического эффекта от внедрения в здравоохранение России стабильно-изотопного ^{13}C -уреазного дыхательного теста на *Helicobacter pylori*, который может составлять более 1 миллиарда рублей в год.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, ^{13}C -уреазный дыхательный тест, экономический эффект.

Summary

The article identifies the sources and presents a calculation of the real and potential direct economic effect from the introduction of a stable isotope ^{13}C -urease breath test for *Helicobacter pylori*, which may amount to more than 1 billion rubles per year, into Russian healthcare.

Key words: *Helicobacter pylori*, ^{13}C -urease breath test, economic effect.

В настоящее время установлено и не вызывает сомнений участие *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) в патогенезе заболеваний верхних отделов желудочно-кишечного тракта [1, 2, 3, 4]. Одним из основных неинвазивных методов диагностики хеликобактериоза в мире признан стабильно изотопный ^{13}C -уреазный дыхательный тест (^{13}C -УДТ) с ^{13}C -карбамидом 99%-ного изотопного обогащения [5]. Тест является, с одной стороны, высокоточным и информативным и, с другой — комфортным при выполнении как для пациентов, так и для медицинского персонала [6]. В РФ ^{13}C -УДТ, как инновационный метод диагностики, включен в действующие клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации [1], но не входит в систему оплаты по обязательному медицинскому страхованию (ОМС) и может выполняться пациентам только в форме оказания платных медицинских услуг. В таких условиях определение экономического эффекта является одним из ведущих факторов при принятии решений о внедрении ^{13}C -УДТ в медицинскую практику руководителями медицинских организаций разных форм собственности.

Целью настоящего исследования явилось определение реального и потенциального прямого экономического эффекта от внедрения ^{13}C -УДТ на *H. pylori* в практическое здравоохранение в РФ.

Для реализации цели поставлены следующие задачи:

1) определить основные источники прямого экономического эффекта от внедрения ^{13}C -УДТ; 2) разработать формулы и установить базовые показатели, необходимые для расчета экономического эффекта; 3) рассчитать реаль-



Рисунок 1. Тест-набор «ХЕЛИКАРБ».

ный и потенциальный прямой экономический эффект для каждого источника и суммарный экономический эффект от внедрения в РФ ^{13}C -УДТ на *H. pylori*.

В задачи настоящего исследования не входило изучение непрямого, опосредованного экономического эффекта, связанного со снижением сроков нетрудоспособности, уменьшением инвалидизации, увеличением активного трудоспособного возраста и т.п. Нами рассмотрен только прямой экономический эффект, позволяющий рациональнее и эффективнее использовать финансовые ресурсы системы здравоохранения.

Определение основных источников потенциального прямого экономического эффекта от внедрения ^{13}C -УДТ

В 2016 году российской компанией «ИЗОКАРБ» создан и зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор) тест-набор «ХЕЛИКАРБ» для ^{13}C -УДТ с ^{13}C -карбамидом 99%-ного изотопного обогащения (см. рис.) [7].

В тест-наборе применен разработанный нами оригинальный одноразовый пакет для сбора проб выдыхаемого воздуха (патент РФ на полезную модель № 170168, приоритет от 13.07.2016) [8], который заменил сдвоенный пакет производства компании Kibion (Швеция, Германия). Такая замена является источником экономического эффекта, так как разработанный пакет в несколько раз дешевле оригинального при более качественных технических и эксплуатационных характеристиках.

В настоящее время в РФ в диагностике *H. pylori* при клинической необходимости выполнения гастроскопии, как правило, выполняется биопсия с морфологической детекцией *H. pylori* либо с «быстрым» уреазным тестом. Замена биопсии на ¹³C-УДТ, особенно у молодых пациентов с функциональной диспепсией и при скрининговых исследованиях, может быть источником прямого экономического эффекта, так как дыхательный тест почти в три раза дешевле, чем биопсия и морфологическое исследование, являясь одновременно более точным и информативным методом диагностики [9].

Материал и методы исследования

Реальный экономический эффект от внедрения новых пакетов в тест-наборе «ХЕЛИКАРБ» рассчитывался на основании фактического количества ¹³C-УДТ, выполняемых в стране в год (2018), потенциальный эффект — по прогнозируемой годовой потребности в тестах. Для расчета реального прямого экономического эффекта применена формула (1)

$ПЭЭ_{(p)} = (ЦП_{(6)} - ЦП_{(м)}) \times КТ_{(p)} - (З_1 + З_2)$ (1), где $ПЭЭ_{(p)}$ — величина реального прямого экономического эффекта в год; $ЦП_{(м)}$ — цена двух пакетов для взятия проб после модернизации; $ЦП_{(6)}$ — базовая цена двух пакетов для взятия проб до модернизации; $КТ_{(p)}$ — реальное количество тестов, проводимое в РФ в год; $З_1$ — затраты на разработку модификации теста; $З_2$ — затраты на внедрение модифицированного теста в объеме реального годового количества тестов.

Для расчета потенциального прямого экономического эффекта применена формула (2)

$ПЭЭ_{(n)} = (ЦП_{(6)} - ЦП_{(м)}) \times КТ_{(n)} - (З_1 + З_3)$ (2), где $ПЭЭ_{(n)}$ — величина потенциального прямого экономического эффекта в год; $ЦП_{(м)}$ — цена двух пакетов для взятия проб после модернизации; $ЦП_{(6)}$ — базовая цена двух пакетов для взятия проб до модернизации; $КТ_{(n)}$ — потенциальная потребность РФ в тестах в год; $З_1$ — затраты на разработку модификации теста; $З_3$ — затраты на внедрение модифицированного теста в объеме потенциального годового количества тестов.

Определены базовые величины для расчета. В 2018 году в РФ выполнено около 45 тысяч ¹³C-УДТ с применением тест-набора «ХЕЛИКАРБ» (данные производителя), для которых использовались 11 ИК-анализаторов IRIS.Doc (данные поставщика приборов). Учитывая, что каждый ИК-анализатор имеет восемь приемных штуцеров для пакетов, общее количество устройств сопряжения, необходимых для адаптации приборов к модифицированным пакетам, составляет 96 штук. При

стоимости изготовления одного штуцера-переходника в 580 руб. (данные ООО «ИЗОКАРБ» — производителя тест-наборов «ХЕЛИКАРБ») затраты на внедрение модифицированного теста в объеме реального годового количества тестов ($З_2$) составляют $580 \times 96 = 55\,680$ руб. Затраты на разработку модификации теста ($З_1$) включают в создание макетов и опытных образцов устройства сопряжения, разработку конструкторской документации и технические испытания изделия. По данным исследовательской лаборатории производителя тест-набора «ХЕЛИКАРБ», они составили 224 тыс. руб. Цена базовой версии сдвоенного пакета Kibion для взятия проб до модернизации, по данным поставщика, составляла 300 руб., аналогичная цена двух пакетов после модернизации составила 28 руб.

При расчете потенциального экономического эффекта условно принята потребность в ¹³C-УДТ в РФ в объеме не менее 1,5 млн тестов в год, основанная на аналогичных показателях других стран. Производительность ИК-анализатора IRIS.Doc, по данным поставщика, составляет 20 тыс. тестов в год, то есть при максимальной производительности потенциальный объем исследований, обеспечивающий реализацию прогнозируемой потребности (1,5 млн тестов в год), можно выполнить на 75 приборах. Вместе с тем опыт клинического применения ИК-анализаторов в 2018 году показывает, что достижимой и оптимальной является загрузка прибора в объеме 50 % от максимальной, выполнение которой можно осуществить на 150 приборах, для которых необходимо $150 \times 8 + 10\%$ (резерв) = 1320 устройств сопряжения. При затратах на производство одного устройства сопряжения 580 руб., затраты на производство всех необходимых устройств составят $580 \times 1320 = 765\,600$ руб.

Для расчета экономического эффекта, связанного с заменой биопсии, и морфологического исследования на ¹³C-УДТ при первичной диагностике заболеваний верхних отделов ЖКТ приняты следующие базовые величины. Население Москвы составляет примерно 10 % населения РФ. По данным ГКУЗ «БМС ДЗМ», общая и первичная заболеваемость язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, гастритом и дуоденитом на протяжении последних лет остается стабильной и суммарно составляет около 32 тыс. случаев в год (31 654 случая в 2015 году). При первичной заболеваемости язвой желудка и двенадцатиперстной кишки, гастритом и дуоденитом необходимы два диагностических исследования: первичная диагностика и контроль проведенной терапии. Следовательно, общее количество первичных исследований для впервые выявленных пациентов с этими нозологическими формами составляет в Москве 32 тыс., а в России в целом примерно 320 тыс. первичных исследований в год. Учитывая, что инфицированность *H. pylori* в Москве составляет около 50 % взрослой популяции, в Казани более 60 %, а в Сибири доходит до 75–80 % [10], и основываясь на утверждении, что инфицированность лиц, обратившихся к гастроэнтерологу, выше, чем в популяции в целом, можно считать, что повторное исследование будет необходимо

не менее чем у 70 % первично обследованных. Это количество по России составит $320\,000 \times 70\% = 224\,000$ повторных тестов. Таким образом, общая потребность России в исследовании инфицированности *H. pylori* для впервые выявленных пациентов с язвой желудка и двенадцатиперстной кишки, гастритом и дуоденитом может составить $320\,000 + 224\,000 = 544\,000$ исследований в год. По тарифам территориальной программы ОМС стоимость гастроскопии составляет 613 руб., стоимость биопсии с детекцией *H. pylori* составляет 3059 руб. Расчетная стоимость одного ^{13}C -УДТ в государственных медицинских организациях составляет 1042,68 руб. Для расчета потенциального прямого экономического эффекта при замене биопсии и морфологического исследования на ^{13}C -УДТ в процессе первичной диагностики *H. pylori* и контроля проведенной эрадикационной терапии применена формула (3)

$$\text{ПЭЭ}_{(n)} = (\text{Ц1}_{(\text{морф.})} - \text{Ц2}_{(\text{C-УДТ})}) \times \text{КТ}_{(n+\text{к})} - \text{ЗП}, (3),$$
 где $\text{ПЭЭ}_{(n)}$ — величина потенциального прямого экономического эффекта в год; $\text{Ц1}_{(\text{морф.})}$ — цена биопсии и морфологического исследования на *H. pylori*; $\text{Ц2}_{(\text{C-УДТ})}$ — расчетная цена выполнения ^{13}C -УДТ; $\text{КТ}_{(n+\text{к})}$ — потенциальное количество тестов в год (первичные + контроль эрадикации); ЗП — затраты на приобретение приборов.

Результаты исследования

1. Реальный прямой экономический эффект от разработки и внедрения одноразовых пакетов в составе тест-набора «ХЕЛИКАРБ», рассчитанный по формуле (1), составляет:

$$\text{ПЭЭ}_{(p)} = (300 - 28) \times 45\,000 - (224\,000 + 55\,680) = 11\,960\,320,00 \text{ руб.}$$

2. Потенциальный прямой экономический эффект от разработки и внедрения одноразовых пакетов в составе тест-набора «ХЕЛИКАРБ» при потенциальном объеме 544 000 тестов в год, рассчитанный по формуле (2), составляет:

$$\text{ПЭЭ}_{(n)} = (300 - 28) \times 544\,000 - (224\,000 + 765\,600) = 146\,978\,400,00 \text{ руб.}$$

3. Расчет экономического эффекта при замене биопсии и морфологического исследования на ^{13}C -УДТ.

А. Расчет потребности в приборах. При потребности в тестах 544 000 в год, производительности приборов 20 000 в год и среднеоптимальной загрузке прибора 50 %, потребность в приборах составляет $(544\,000 / 20\,000) / 50\% = 55$ штук.

Б. Расчет затрат на приборы. При цене поставки одного ИК-анализатора IRIS.Doc (Kibion; Швеция, Германия) 2 500 000,00 руб. затраты на покупку 55 приборов составят $2\,500\,000 \times 55 = 137\,500\,000,00$ руб. При условии государственной регистрации ИК-спектрометра HCBT-01 производства компании Headway (Китай), цена которого составляет 950 000,00 руб., а качество результатов почти не уступает масс-спектрометрии [11], затраты на покупку

аналогичного количества приборов составят $950\,000 \times 55 + 1\,000\,000$ (затраты на испытания и регистрацию) = 53 250 000,00 руб.

В. Расчет потенциального экономического эффекта. При условии применения зарегистрированного ИК-спектрометра IRIS.Doc (Kibion; Швеция, Германия) потенциальный прямой экономический эффект, рассчитанный по формуле (3), составляет:

$$\text{ПЭЭ}_{(n)} = (3059,90 - 1042,68) \times 544\,000 - 137\,500\,000,00 = 959\,867\,680,00 \text{ руб.}$$

При условии регистрации и применения ИК-спектрометра «HCBT-01» производства компании Headway (Китай) потенциальный прямой экономический эффект, рассчитанный по формуле (3) может составить:

$$\text{ПЭЭ}_{(n)} = (3059,90 - 1042,68) \times 544\,000,00 - 53\,250\,000,00 = 1\,044\,117\,680,00 \text{ руб.}$$

Таким образом, расчеты показывают, что суммарный прямой экономический эффект от внедрения в практическое здравоохранение тест-набора «ХЕЛИКАРБ» с новыми пакетами и замены биопсии с морфологической детекцией *H. pylori* на ^{13}C -УДТ может составлять более 1 млрд руб. в год. Такой экономический эффект дает веские основания рекомендовать внедрение ^{13}C -УДТ не только в качестве более точного метода диагностики, но и метода, способного оптимизировать финансовые затраты здравоохранения РФ на диагностику хеликобактерной инфекции.

Список литературы

- Ивашкин В.Т., Маев И.В., Лапина Т.Л., Шептулин А.А. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых. // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 2018. — 28 (1). — С. 55–70.
- Лазебник Л.Б., Бордин Д.С. Диагностика и лечение инфекции *Helicobacter pylori* в России: результаты проспективной наблюдательной программы «КАЙДЗЕН». // Эффективная фармакотерапия. — 2016. — 15. — С. 12–22.
- Маев И.В., Самсонов А.А., Андреев Д.Н. Инфекция *Helicobacter pylori*. — М.: «ГЭОТАР-Медиа». — 2016. — 256 С.
- Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection — the Maastricht V/Florence Consensus Report. // Gut. — 2016. — 10. — P. 1–24.
- Graham D.Y. Efficient identification and evaluation of effective *Helicobacter pylori* therapies. // Clin. Gastroenterol. Hepatol. — 2009. — 7 (2). — P. 145–8.
- Рапопорт С.И., Шубина Н.А. ^{13}C -дыхательный тест — возможности и ограничения в диагностике заболеваний органов пищеварения. — М.: МИА. — 2014. — 240 С.
- Плавник Р.Г., Рапопорт С.И., Плавник К.Р. и др. «ХЕЛИКАРБ» — первый российский дыхательный тест с ^{13}C -мочевинной 99 % обогащения на *Helicobacter pylori*: от идеи до регистрации. // Клин. мед. — 2017. — 95 (1). — С. 78–84.
- Плавник Р.Г., Плавник К.Р., Воронцов Е.М. Пакет для сбора проб выдыхаемого воздуха с длительным сохранением стабильной концентрации углекислого газа в пробе. Патент РФ на полезную модель № 170168, приоритет от 13.07.2016.
- Захарова Н.В., Симаненков В.И., Бакулин И.Г. и др. Распространенность хеликобактерной инфекции у пациентов гастроэнтерологического профиля в Санкт-Петербурге. // Фарматека. — 2016. — Гастроэнтерология / Гепатология. — С. 33–9.
- Решетников О.В., Курилович С.А., Кротов С.А., Кротова В.А. Хеликобактерная инфекция в сибирских популяциях. // Бюллетень СО РАМН. — 2010. — 30 (2). — С. 88–93.
- Плавник Р.Г., Невмержицкий В.И., Буторова Л.И., Плавник Т.Э. Сравнительная оценка масс-спектрометрии и инфракрасной спектрометрии при проведении ^{13}C -уреазного дыхательного теста на *Helicobacter pylori*. // Клин. мед. — 2015. — 93 (9). — С. 42–5.

Для цитирования. Плавник Р.Г., к.м.н., зам. ген. директора по науке и внедрению. Экономическая эффективность внедрения ^{13}C -уреазного дыхательного теста на *Helicobacter pylori* в России // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 58–61.





ИЗОКАРБ

ХЕЛИКАРБ

Первый в РФ тест-набор ^{13}C -карбамидом 99 % обогащения

РУ Росздравнадзора № РЗН 2016/3773 от 29 февраля 2016 года



**^{13}C -уреазный дыхательный тест — «ЗОЛОТОЙ СТАНДАРТ»
в диагностике *Helicobacter pylori* (Маастрихт II-V)**

ПРЕИМУЩЕСТВА:

Высокая точность (до 100%) • Неинвазивность
Безопасность • Комфорт

Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых (2018)

1. Референсными методами первичной диагностики НР служат дыхательный тест с мочевиной, меченой ^{13}C , и определение антигена НР в кале лабораторным способом

2. В качестве метода первичной диагностики у лиц, у которых имеются показания к проведению ЭГДС, может быть использован быстрый уреазный тест с получением биоптата из антрального отдела и тела желудка

3. Серологические методы определения антител к НР могут быть назначены в качестве первичной диагностики ... после недавнего приема антисекреторных или антибактериальных средств, при язвенном кровотечении, атрофическом гастрите

4. Оценку эффективности ЭТ необходимо осуществлять с помощью дыхательного теста с мочевиной, меченой ^{13}C , или определения антигена НР в кале лабораторным способом не ранее, чем через 4 недели после окончания курса ЭТ. Серологические методы в этой ситуации НЕ ПРИМЕНЯЮТ

5. При отсутствии возможности применения референсных методов целесообразно комбинировать доступные диагностические тесты».

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ:

ООО «ИЗОКАРБ» (РОССИЯ)
ТЕЛЕФОН: +7(495)255-38-48
E-MAIL: INFO@ISOCARB.RU

Функциональная способность нейтрофилов у больных ишемической болезнью сердца

В. Ю. Мишланов, д.м.н., проф., член-корр. РАН, зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней № 1

В. Е. Владимирский, д.м.н., доцент, зав. кафедрой факультетской терапии № 1 с курсом физиотерапии ФДПО

А. В. Туев, д.м.н., проф., заслуженный деятель науки России, проф. кафедры госпитальной терапии № 1

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

Functional ability of neutrophils in patients with ischemic heart disease

V. Yu. Mishlanov, V. E. Vladimirsky, A. V. Tuev

Perm State Medical University n.a. E. A. Wagner, Perm, Russia

Резюме

Цель. Изучение белокпродуцирующей и липидвысвобождающей способности нейтрофилов и ее клинической значимости у больных ИБС. **Материалы и методы.** Обследованы 25 пациентов с артериальной гипертензией без клинических и ультразвуковых манифестаций атеросклероза; 47 больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения, а также 19 больных первичной нестабильной стенокардией. Группа сравнения — 33 практически здоровых лица. В сыворотке крови посредством иммуноферментного анализа оценивалась концентрация С-реактивного белка (СРБ), липопротеина а (ЛПв), VII фактора свертывания крови (VIIф), дефензинов-альфа (1–3), интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-8 (ИЛ-8), фактора некроза опухоли альфа (ФНО-альфа). Из периферической крови в присутствии декстранов выделялись лейкоциты, представленные преимущественно нейтрофилами, которые в дальнейшем культивировались, в лейкоцитарных супернатантах оценивалось содержание СРБ, ЛПв, дефензинов-альфа (1–3), VIIф, а также липидвысвобождающей способности лейкоцитов (ЛВЛ) по методике А. В. Туева и В. Ю. Мишланова. Проводились ангиографическое исследование, дуплексное сканирование артерий и эхокардиография. **Результаты.** Установлено, что у больных на этапе доклинического атеросклеротического поражения способность лейкоцитов к образованию белково-липидных комплексов (БЛК), маркируемая величиной ЛВЛ, практически не отличается от здоровых лиц, но уже на этой стадии атерогенеза выявлено увеличение их способности к продукции противомикробных пептидов — дефензинов-альфа (1–3). У больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения отмечено увеличение продукции лейкоцитами широкого спектра белков — дефензинов-альфа (1–3), VIIф, ЛПв и СРБ в сочетании с признаками системной воспалительной реакции, маркируемой высокими концентрациями СРБ, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли альфа в сыворотке крови. На данном этапе атерогенеза величина ЛВЛ значимо отличается от значений, характерных для здоровых лиц. Показано, что чем больше значение ЛВЛ, тем выше у этих больных функциональный класс хронической сердечной недостаточности ($R = 0,4$; $p = 0,02$). У больных ИБС с первичной нестабильной стенокардией выявлена максимальная величина ЛВЛ, а у пациентов с ультразвуковыми признаками нестабильности бляшек — высокие концентрации СРБ в нейтрофильных супернатантах. Корреляционный анализ выявил, что у больных ИБС средний процент стеноза коронарных артерий, по данным ангиографии, напрямую взаимосвязан с величиной ЛВЛ ($R = 0,7$; $p = 0,03$) и сывороточной концентрацией ФНО-альфа ($R = 0,5$; $p = 0,03$), а количество клинически значимых стенозов — с величиной ЛВЛ ($R = 0,4$; $p = 0,04$) и концентрацией в супернатантах VIIф ($R = 0,5$; $p = 0,04$). **Заключение.** Величина ЛВЛ, содержание СРБ и дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах у больных ИБС взаимосвязаны с тяжестью и активностью атеросклеротического поражения артерий, что подтверждается результатами обследования больных на этапе доклинического, клинически манифестного стабильного и нестабильного атеросклеротического поражения.

Ключевые слова: атеросклероз, нейтрофилы, врожденный иммунитет, воспаление, ишемическая болезнь сердца.

Summary

Purpose. The study of protein-producing and lipid-releasing ability of neutrophils and its clinical significance in patients with IHD. **Materials and methods.** 25 patients with arterial hypertension without clinical and ultrasound manifestations of atherosclerosis were examined; 47 patients with coronary artery disease with stable angina, as well as 19 patients with unstable primary angina. The comparison group — 33 healthy persons. In the serum, enzyme-linked immunosorbent assay was used to evaluate the concentration of C-reactive protein (CRP), lipoprotein a (Lp(a)), VII coagulation factor VII (VIIF), defensins-alpha (1–3), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). Leukocytes, predominantly represented by neutrophils, which were further cultivated, were excreted from peripheral blood in the presence of dextrans; the levels of CRP, Lp(a), defensins-alpha (1–3), VIIF, and lipid-releasing ability of leukocytes (LRAL) were assessed according to the method of A. V. Tuev and V. Yu. Mishlanov. An angiographic study, duplex scanning arteries, and echocardiography were performed. **Results.** It has been established that in patients at the stage of preclinical atherosclerotic lesion, the ability of leukocytes to form protein-lipid complexes (PLC), marked by LRAL, practically does not differ from healthy individuals, but already at this stage of atherogenesis an increase in their ability to produce antimicrobial peptides — defensins-alpha (1–3). In patients with coronary artery disease with stable angina pectoris, an increase in leukocyte production of a wide range of proteins — defensins-alpha (1–3), VIIF, Lp(a) and CRP in combination with signs of a systemic inflammatory reaction, marked by high concentrations of CRP, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in serum, was noticed. At this stage of atherogenesis, the value of LRAL is significantly different from the values of healthy individuals. It is shown that the higher the LRAL value, the higher the functional class of chronic heart failure in these patients ($R = 0,4$; $p = 0,02$). In patients with coronary artery disease with primary unstable angina, the maximum LRAL value was detected, and in patients with ultrasound signs of plaque instability, high concentrations of CRP in neutrophilic supernatants were found. Correlation analysis revealed that, in patients with coronary artery disease, the average percentage of coronary artery stenosis, according to angiography, is directly related to the LRAL value ($R = 0,7$; $p = 0,03$) and the serum concentration of TNF-alpha ($R = 0,5$; $p = 0,03$), and the number of clinically significant stenoses — with the magnitude of LRAL ($R = 0,4$; $p = 0,04$) and the concentration in supernatants VIIF ($R = 0,5$; $p = 0,04$). **Conclusion.** The LRAL value, CRP and defensin-alpha content in leukocyte supernatants in IHD patients are interconnected with the severity and activity of atherosclerotic lesion of arteries, which is confirmed by the results of examination of patients at the stage of preclinical, clinically manifest stable and unstable atherosclerotic lesion.

Key words: atherosclerosis, neutrophils, innate immunity, inflammation, coronary heart disease.

Список сокращений

AUC — Area Under Curve, P — percentile, ROC — Receiver Operator Characteristic, VIIф — VII фактора свертывания крови, АГ — артериальная гипертензия, БЛК — белково-липидные комплексы, БПСН — белокпродуцирующая способность нейтрофилов, ИФА — иммуноферментный анализ, ИЛ-6 — интерлейкин-6, ИЛ-8 — интерлейкин-8, ИБС — ишемическая болезнь сердца, КАГ — коронароангиография, ЛВСЛ — липид-высвобождающая способность лейкоцитов, ЛПА — липопротеин-а, мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота, СРБ — С-реактивный белок, ХС — холестерин, ФНО-альфа — фактор некроза опухоли альфа.

Введение

Основой патогенеза ишемической болезни сердца (ИБС) является атеросклероз — патологический процесс, существование которого, несмотря на многочисленные исследования, на сегодняшний день остается не до конца изученной. К настоящему времени сложилось четкое представление об атеросклерозе как о мультифакториальном заболевании, в основе которого лежат сложные нарушения биохимических, иммунных и молекулярно-генетических процессов.

Вне зависимости от этиологического фактора, запускающего атеросклеротический процесс, неизменными участниками его патогенеза являются лейкоциты. Участие в процессах атерогенеза моноцитов, лимфоцитов достаточно хорошо изучено. Малоисследованной остается роль в процессах атерогенеза самой многочисленной фракции лейкоцитов — нейтрофилов. Несмотря на короткий период своей жизни, лейкоциты за счет своей многочисленности и функциональной активности составляют основную линию защиты человека против бактериальных агентов, участвуют в механизмах неспецифической защиты, в том числе и врожденного иммунитета.

Роль и место нейтрофилов в процессах атеросклеротического повреждения сосудистой стенки активно изучается последние 15–20 лет. Это обусловлено появившимися в начале XXI века данными о связи количества нейтрофилов с риском инфаркта миокарда (ИМ) [1]; кроме того, показана более сильная предикторная значимость в прогнозировании сосудистых событий количества нейтрофилов периферической крови, чем высокочувствительного С-реактивного белка (СРБ) [1]. В экспериментальном исследовании на крысах Van Leveen M., *et al.* (2004) впервые показали возможность развития спонтанной нейтрофильной инфильтрации сосудистой стенки [2]. Последующие работы Zerneke A., *et al.* (2009) продемонстрировали, что введение антинейтрофильных антител замедляло развитие атеросклероза у кроликов при наложении сосудистых муфт [3].

Установлено, что нейтрофилы в процессе атерогенеза проникают в артерии, где их непродолжительный срок службы увеличивается под влиянием воспалительных цитокинов. Это способствует дальнейшему прогрессированию воспаления и нестабильности бляшки. Механизмы, с помощью которых нейтрофилы способствуют дестабилизации бляшки, по-прежнему находятся на стадии изучения, но выяснено, что они связаны с высвобождением активных форм кислорода, миелопероксидазы, протеолитических ферментов, метаболитов арахидоновой кислоты и ряда белков [4].

Нейтрофилы в условиях межклеточного контакта или стимуляции провоспалительными цитокинами синтезируют и высвобождают пептиды и белки, связывающие холестерин (ХС) [5]. Предполагается, что такая способность клеток реализуется не в кровотоке, а в очаге воспаления или сосудистой стенке. Мишлановым В. Ю. и Туевым А. В. (1999) предложен

метод регистрации общего количества белков и пептидов, синтезируемых и высвобождаемых нейтрофилами, которые связывают холестерин (ХС), — определение липидвысвобождающей способности лейкоцитов (ЛВСЛ) [6, 7, 8]. Было показано, что величина ЛВСЛ связана с функциональной активностью нейтрофилов. Об этом свидетельствовали эксперименты с определением концентрации ХС в супернатантах после выделения клеток в градиенте фиколл-верографин 1077 и при отстаивании в растворе декстрана. Клетки крови, выделенные на градиенте плотности фиколл-верографина 1077, были представлены преимущественно лимфоцитами (78–85 %), а при отстаивании в декстране — на 70–80 % нейтрофилами. При попытке определения концентрации ХС в супернатантах культур клеток, выделенных в градиенте плотности фиколл-верографина 1077, результаты оказались приблизительно в 3,6 раза ниже, чем в случаях отстаивания в присутствии раствора декстрана (согласно методике определения ЛВСЛ) [6, 7, 8]. Определяющая роль нейтрофилов в формировании величины ЛВСЛ подтверждена в исследованиях, которые показали, что нейтрофилы больных ИБС демонстрируют значимо большую выживаемость в ходе культивирования, чем у здоровых лиц. Кроме того, корреляционный анализ установил взаимосвязь между способностью нейтрофилов выживать в условиях культивирования и высвобождением холестерина ($R = 0,49$; $p = 0,02$) [6].

Продолжением этих работ явилось изучение белковой продукции нейтрофилами в тех же условиях с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), данная функциональная активность названа белокпродуцирующей способностью нейтрофилов (БПСН) [9]. Похожий методический подход использовался Blidberg K. (Каролинский университет, 2012), когда в ходе культивирования нейтрофилов больных бронхо-легочными заболеваниями оценивали содержание в супернатантах молекул адгезии [10].

Оставалась недостаточно изученной специфика ЛВСЛ и БПСН у больных, имеющих только факторы риска атеросклеротического поражения коронарного русла (артериальная гипертензия [АГ] и курение), клинически стабильную (стабильная стенокардия напряжения) и нестабильную (первичная нестабильная стенокардия) форму ИБС, а также взаимосвязь данной функциональной способности нейтрофилов со структурным и функциональным состоянием сердечно-сосудистой системы.

Целью исследования было изучение белокпродуцирующей и липидвысвобождающей способности нейтрофилов и ее клинической значимости у больных ИБС.

Материал и методы

Выполнено рандомизированное одномоментное сравнительное исследование. Всего в исследование было включено 124 лица. Группу больных с факторами риска атеросклероза

составили 25 пациентов с артериальной гипертензией (АГ) без клинических и ультразвуковых манифестаций атеросклероза (средний возраст — 56,5 года (Me); перцентиль (P) 10% — 47,3; P 90% — 65,2 года); с локализованным неосложненным течением атеросклероза — 47 больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения (средний возраст 60,2 года; P 10% — 50,2; P 90% — 70,0 года), а также с осложненным течением атеросклероза — 19 больных первичной нестабильной стенокардией по классификации Ю. Браунвальда (средний возраст — 60,3 года; P 10% — 55,4, P 90% — 64,2 года). В исследование не включались пациенты с сахарным диабетом, острыми и хроническими заболеваниями с воспалительным синдромом, перенесшие острые сосудистые события в течение предшествующих 6 месяцев. Все группы клинически манифестного атеросклероза имели ассоциацию с АГ. Группу сравнения составили 33 практически здоровых человека (средний возраст — 52,7 года; P 10% — 41,2; P 90% — 62,3 года). Группы наблюдения и сравнения были сопоставимы по возрастному и половому составу. Процент курящих в группе больных АГ составил 59%, стабильной стенокардией напряжения — 73%, первичной нестабильной стенокардией — 71%. Среди здоровых лиц курящих не было. Атеросклеротическое поражение верифицировалось на основании клинических признаков, дуплексного сканирования и ангиографии. Для оценки тяжести хронической сердечной недостаточности (ХСН) всем пациентам групп наблюдения выполнялись тест шестиминутной ходьбы и ультразвуковое исследование сердца. Все пациенты с клинически манифестным атеросклерозом получали стандартную терапию статинами, аспирином, ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента и β -блокаторами.

Исследование ЛВСЛ проводилось в иммунологической лаборатории ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера по авторскому методу А. В. Туева и В. Ю. Мишланова [6]. Для этого из венозной крови больного в стерильных условиях выделяли лейкоцитарную взвесь, используя метод отстаивания в центрифужных пробирках смеси венозной крови и раствора полиглобулина в соотношении 5:3. Суспензию лейкоцитов тщательно отмывали от полиглобулина сначала путем осторожного ресуспендирования в физиологическом растворе хлорида натрия с последующим центрифугированием для осаждения клеток, затем отмывку производили в питательной среде «Игла». После отмывки лейкоциты ресуспендировали в питательной среде. Проводили количественный подсчет выделенных клеток и готовили взвесь, содержащую 50000 лейкоцитов в 1 мкл среды. Соотношение лейкоцитов в выделенной суспензии приближалось к таковому в цельной крови при значительном преобладании нейтрофилов (60–80%). После строгого количественного учета 400 мкл суспензии лейкоцитов культивировали при 37 °C в течение 3 суток в неполной питательной среде в пенициллиновых флаконах. Через 3 суток в надосадочной жидкости определяли содержание ХС холестериноксидазным методом (тест-набор фирмы Human).

Для уточнения механизмов регуляции ЛВСЛ у больных ИБС выполнено экспериментальное исследование *in vitro*, заключавшееся в определении влияния ФНО-альфа на величину ЛВСЛ, для чего проводилось ее определение в контрольной (с внесенной из вне 20 мкл питательной

среды) и опытной (с внесенным из вне 20 мкл раствора ФНО-альфа в конечной концентрации 0,005 мкг/мл) культурах лейкоцитов (выполнено девять экспериментов).

Посредством ИФА оценивался белково-пептидный паттерн сыворотки крови и супернатантов трехсуточных лейкоцитарных культур (по методике Мишланова В. Ю. и Владимирского В. Е. [9]). В сыворотке крови определялась концентрация интерлейкинов –6 и –8 (ИЛ-6, ИЛ-8, тест-наборы фирмы «Вектор-Бест Урал», Новосибирск), фактора некроза опухоли α (ФНО-альфа, тест-набор фирмы «Вектор-Бест Урал», Новосибирск), дефензинов-альфа (1–3) с помощью тест-набора фирмы Nycult Biotech, липопротеина (а) (ЛП_а, набор фирмы Assa Pro), С-реактивного белка (СРБ, тест-набор фирмы «Вектор-Бест Урал», Новосибирск), VII фактора свертывания крови (VII_ф, набор фирмы Assa Pro). В супернатантах трехсуточных культур нейтрофилов оценивалось содержание дефензинов-альфа 1–3, СРБ, VII_ф, ЛП (а).

Выбор изученных белков и пептидов обусловлен следующими факторами: их причастностью к системе врожденного иммунитета (СРБ, дефензины-альфа, цитокины) [11, 12], способностью ограничивать патологический очаг как простейший механизм палеоиммунитета (VII_ф, ЛП_а) [13, 14, 15], формировать БЛК (СРБ, дефензины-альфа, ЛП_а, VII_ф) [11, 15], доказанной атерогенностью (СРБ, дефензины-альфа, ЛП_а) [11, 12, 14], а также возможностью лейкоцитов их продуцировать (СРБ, дефензины, VII_ф) [11, 12, 14].

Статистическая обработка результатов производилась при помощи программного пакета Statistica 8.0. Оценка статистической значимости отличий признаков независимых друг от друга группировок проводилась по критерию Манна-Уитни. При сравнении трех и более групп для оценки межгрупповых различий использовался критерий Крускала-Уоллиса. Для определения наличия связи между признаками использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Точность и эффективность диагностических тестов определялась путем построения ROC-кривых (Receiver Operator Characteristic). Для интерпретации использовался показатель AUC (Area Under Curve) — площадь под кривой. Для оценки дифференциально-диагностической значимости паттерна изучаемых факторов применялся метод логистической регрессии. В последующем использовался ROC-анализ для оценки диагностической эффективности полученной математической модели, комплексно характеризующей изучаемые показатели. Количественные данные представлены в виде медианы (Me), перцентилей (P) 10 и 90%.

Результаты

В нашем исследовании показано, что у больных АГ в сравнении со здоровыми лицами оказалось достоверно выше содержание в сыворотке крови ЛП_а и дефензинов-альфа (см. табл.). При этом в лейкоцитарных супернатантах пациентов с АГ выявлялась значимо более высокая концентрация дефензинов-альфа, чем у здоровых, что может указывать на изменение способности лейкоцитов к высвобождению факторов противомикробной защиты в отсутствие очагов инфекции. В группе больных АГ ЛВСЛ только в 32% случаев превышала значения здоровых лиц.

Таблица
Статистическая значимость различий изучаемых биомаркеров у здоровых лиц, больных АГ без клинических проявлений атеросклероза и ИБС со стабильной стенокардией напряжения

Показатель, единицы измерения	Группа 1 здоровые лица, Me (percentile 10/90) (n = 33)	Группа 2 больные АГ, Me (percentile 10/90) (n = 25)	Группа 3 больные ИБС со ста- бильной стенокарди- ей напряжения, Me (percentile 10/90) (n = 47)	p (группы 1–2), статистика U Манна-Уитни	p (группы 1–3), статистика U Манна-Уитни	p (группы 2–3), статистика U Манна-Уитни	p (группы 1–2–3), критерий Крускала- Уоллиса
ЛВСЛ, ммоль/л	0,13 (0,1/0,15)	0,12 (0,07/0,16)	0,16 (0,09/0,25)	0,67	0,010	0,001	0,0001
СРБ в сыворотке крови, мг/л	2,30 (0,22/2,3)	4,12 (1,66/15,25)	6,99 (1,88/10,29)	1,00	0,001	0,740	0,0001
СРБ в супернатанте, мкг/л	18,34 (1,7/32,6)	55,9 (18,3/130,0)	49,57 (16,25/106,00)	1,00	0,001	0,650	0,0060
ЛПА в сыворотке крови, нг/мл	8,68 (5,66/8,68)	39,89 (22,05/68,75)	42,65 (26,90/40,50)	0,04	0,001	0,230	0,0001
ЛПА в супернатанте, нг/мл	25,60 (13,53/45,85)	52,19 (32,5/84,00)	37,73 (23,55/55,25)	1,00	0,001	0,510	0,0020
VIIф в сыворотке крови, нг/мл	1,92 (0,8/1,92)	4,93 (2,53/7,28)	5,59 (3,34/8,80)	1,00	0,001	0,780	0,0001
VIIф в супернатанте, нг/мл	0,26 (0/0,51)	2,37 (0,78/4,74)	2,38 (0,72/4,51)	1,00	0,001	0,850	0,0001
Дефензины альфа в сыворотке крови, пг/мл	626 (270/1376)	6577 (3390/11296)	4389 (2096/7932)	0,01	0,030	0,090	0,0001
Дефензины альфа в супернатанте, пг/мл	117206 (11420/200000)	518428 (109300/863000)	656635 (406000/921150)	0,05	0,010	0,020	0,0001
ИЛ 6 в сыворотке крови, пг/мл	1,04 (0,8/1,5)	2,48 (0,11/7,30)	12,67 (1,3/52,64)	0,16	0,001	0,001	0,0001
ИЛ 8 в сыворотке крови, пг/мл	5,34 (0/24,4)	8,52 (0/27,3)	48,13 (0,00/154,25)	0,06	0,001	0,090	0,3000
ФНО-альфа в сыворотке крови, пг/мл	3,9 (1,1/7,9)	6,19 (1,8/12,8)	29,67 (1,45/66,05)	0,09	0,001	0,010	0,0430

Примечание: VIIф — VII фактор свертывания крови, АГ — артериальная гипертензия, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИЛ-6 — интерлейкин-6, ИЛ-8 — интерлейкин-8, ЛВСЛ — липидвысвобождающая способность лейкоцитов, ЛПА — липопротеин-а, СРБ — С-реактивный белок, ФНО-альфа — фактор некроза опухоли альфа.

Группа больных ИБС была представлена лицами с II (18%) и III функциональным классом (82%) стенокардии напряжения. По данным коронароангиографии (КАГ), средний процент выявленного стеноза составил 76 (Р 10% — 30; Р 90% — 96)%, а количество клинически значимых стенозов — 3 (Р 10% — 1; Р 90% — 5).

Показано, что у пациентов с ИБС содержание всех изучаемых показателей в сыворотке и супернатантах было выше, чем у практически здоровых лиц (табл. 1).

Особенностью пациентов данной группы является то, что у них выявлена прямая зависимость между величиной ЛВСЛ и содержанием дефензинов-альфа ($R = 0,47$; $p = 0,03$) в лейкоцитарных супернатантах, что свидетельствует о возможной общности процессов продукции лейкоцитами этих пептидов и образования БЛК. Корреляционный анализ выявил, что средний процент стеноза коронарных артерий, по данным КАГ, напрямую взаимосвязан с величиной ЛВСЛ ($R = 0,7$; $p = 0,03$) и сывороточной концентрацией ФНО-альфа ($R = 0,5$; $p = 0,03$), а количество клинически значимых стенозов — с величиной ЛВСЛ ($R = 0,4$; $p = 0,04$) и концентрацией в супернатантах VIIф ($R = 0,5$; $p = 0,04$). Показано, что чем больше значение ЛВСЛ, тем выше функциональный класс ХСН, определенный с учетом результатов теста шестиминутной ходьбы ($R = 0,4$; $p = 0,02$). Установлены

прямая умеренной силы связь величины ЛВЛС с конечно-диастолическим размером левого желудочка ($R = 0,34$; $p = 0,01$), средним давлением в легочной артерии ($R = 0,46$; $p = 0,02$), а также отрицательного характера зависимость с фракцией выброса левого желудочка ($R = -0,35$; $p = 0,008$).

Было произведено сравнение результатов специального обследования больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения в сочетании с АГ с данными, полученными у пациентов с АГ без клинически манифестного атеросклероза. Показано, что величина ЛВСЛ, концентрации дефензинов-альфа в супернатантах, а в сыворотке ИЛ-6 и ФНО-альфа достоверно выше у больных ИБС (см. табл.). Определены точки разделения по изучаемым показателям между больными ИБС со стабильной стенокардией напряжения и АГ путем построения ROC-кривых. Концентрации дефензинов-альфа в супернатанте более 300214 пг/мл, ИЛ-6 в сыворотке крови более 2,58 пг/мл и величина ЛВСЛ выше 0,15 ммоль/л являются хорошими разделительными критериями между больными ИБС стабильного течения и АГ (по критерию AUC), а содержание ФНО-альфа в сыворотке крови свыше 12,23 пг/мл — средним по эффективности показателем. Для комплексной оценки различий белково-пептидного паттерна больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения и АГ выбраны значения концентрации

дефензинов-альфа в супернатантах, ИЛ-6 и ФНО-альфа в сыворотке крови, а также величина ЛВСЛ, на основании которых построено уравнение логистической регрессии:

$$y = -9,545 + 36,288 \cdot x_1 + 0,000022028 \cdot x_2 + 0,04186 \cdot x_3 + 0,07562 \cdot x_4,$$

где x_1 — величина ЛВСЛ, x_2 — концентрация дефензинов-альфа в супернатантах, x_3 — концентрация ИЛ-6 в сыворотке крови и x_4 — концентрация ФНО-альфа в сыворотке крови (p [правдоподобия] = 0,001). Данный комплексный подход к дифференциальной диагностике этих заболеваний имел очень хорошую разделительную эффективность ($AUC = 0,83$).

Среди пациентов с первичной нестабильной стенокардией 44% имели клинику прогрессирующей стенокардии, 31% — острой и 25% — подострой стенокардии покоя. Средний процент стеноза коронарных артерий составил 71 (Р 10% — 38; Р 90% — 93)%, а количество клинически значимых стенозов — 2 (Р 10% — 1; Р 90% — 3).

Статистический анализ различий изучаемых показателей у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения и нестабильной стенокардией показал, что у больных ИБС нестабильного течения величина ЛВСЛ была значимо выше (0,21 [Р 10% — 0,19; Р 90% — 0,24] ммоль/л), чем у пациентов со стабильным течением (0,16 [Р 10% — 0,09; Р 90% — 0,25] ммоль/л) ($p = 0,041$). Путем построения ROC-кривых определена разделительная эффективность изученных биомаркеров между больными со стабильной стенокардией напряжения и нестабильной стенокардией. Значение ЛВСЛ у больных ИБС нестабильного течения более 0,18 ммоль/л ($AUC = 0,77$) рассматривалось как хороший по эффективности разделительный критерий стабильного и нестабильного течения заболевания.

При разделении группы пациентов с ИБС по принципу выявления у них признаков нестабильных и стабильных атеросклеротических бляшек по данным дуплексного сканирования артерий установлено, что из всех факторов наилучшую разделительную эффективность между этими подгруппами имеет значение концентрации СРБ в лейкоцитарных супернатантах свыше 70 мкг/л ($AUC = 0,95$), кроме того, установлена сильная прямая зависимость нестабильного характера атеросклеротической бляшки по данным дуплексного сканирования с содержанием СРБ в лейкоцитарных супернатантах ($R = 0,82$; $p = 0,03$).

В проведенном экспериментальном исследовании *in vitro* установлено, что во всех девяти экспериментах добавление в культуральную среду ФНО-альфа в дозе 0,005 мкг/мл вызывало повышение величины ЛВСЛ. ЛВСЛ до внесения препарата составила 0,15 (Р 10% — 0,09; Р 90% — 0,18), после — 0,35 (Р 10% — 0,19; Р 90% — 0,46) ммоль/л. Различия между группами статистически достоверно ($p = 0,027$).

Обсуждение и заключение

Нами получены данные, подтверждающие большое значение нейтрофилов в процессах атеросклеротического поражения сосудов. Результаты проведенного экспериментального исследования свидетельствуют о возможности регуляции ЛВСЛ у больных ИБС провоспалительными цитокинами, в частности ФНО-альфа, что указывает на то, что нейтрофилы в условиях тесного межклеточного контакта способны не только пассивно (в результате гибели),

но и активно образовывать БЛК. В пользу способности нейтрофилов к активному образованию БЛК свидетельствуют опубликованные данные о связи величины ЛВСЛ и выживаемости нейтрофилов в культурах [6].

Термин «белокпродуцирующая способность нейтрофилов» использован для совокупной характеристики нескольких функций нейтрофилов: белоксинтезирующей способности, процессинга белковых молекул и голокриновой секреции. С учетом проведенных исследований, построенных математических моделей белково-пептидных паттернов в группе больных ИБС, удалось установить, что для них характерен широкий спектр провоспалительных и атерогенных белков, обнаруживаемых в лейкоцитарных супернатантах в высоких концентрациях, но наибольшее значение имеют дефензины альфа и СРБ.

Нами не предполагалось изучение полного спектра контролирующих воспаление факторов, продуцируемых нейтрофилами, так как это является приоритетом отдельного патофизиологического исследования. Выбор дефензинов-альфа определен имеющимся у них особым набором проатерогенных свойств. Дефензины-альфа и липопротеины низкой плотности образуют стабильные комплексы в растворе и на поверхности клеток [5]. В связи с этим альфа-дефензины, секретируемые активированными нейтрофилами, обеспечивают связь между воспалением и атеросклерозом, изменяя катаболизм от рецепторного пути на менее эффективный рецепторнезависимый путь, опосредованный протеогликанами. Дефензины увеличивают тропность ЛПНП к эндотелию примерно в четыре раза, а к гладкомышечным клеткам — примерно в шесть раз [5]. Кроме того, дефензины-альфа тормозят фибринолиз, опосредованный тканевым плазминогеном. Этот процесс способствует развитию атеросклеротических поражений [5].

СРБ синтезируется в основном в печени, хотя установлено, что белок могут синтезировать нейроны, клетки почек, моноциты, лимфоциты и макрофаги альвеол. Одно время считали, что СРБ может синтезироваться атеросклеротическими бляшками, так как уровень СРБ в них на порядок выше, чем в окружающих тканях, однако было установлено, что СРБ синтезируют находящиеся в бляшках макрофаги и гладкомышечные клетки. Показано, что эндотелиоциты аорты человека не только содержат матричную рибонуклеиновую кислоту (мРНК) СРБ, но синтезируют и секретируют СРБ. Нами подтверждены известные данные о возможности внепеченочного синтеза СРБ мононуклеарами периферической крови [16], о чем свидетельствует обнаружение данного белка в супернатантах трехсуточных нейтрофильных культур. Касательно ВПФ также известна возможность синтеза данной сериновой протеиназы лейкоцитами (работы З.С. Баркагана), что объясняет результаты нашей работы, связанные с обнаружением посредством ИФА в трехсуточных супернатантах нейтрофильных культур этого фактора.

В нашем исследовании получены данные о взаимосвязи величины ЛВСЛ, интегрально характеризующей способность нейтрофилов к образованию БЛК с распространенностью и тяжестью атеросклеротического поражения по данным КАГ, концентрации СРБ в нейтрофильных супернатантах с нестабильным характером атеросклеро-

тических бляшек по данным дуплексного сканирования. Показана эволюция БПСН и ЛВСЛ на этапах доклинических атеросклеротических проявлений, клинически манифестного стабильного и нестабильного атерогенеза.

Участие механизмов врожденного иммунитета в патогенезе ХСН без инфекционной индукции — известный научный факт [17]. Взаимосвязь системы врожденного иммунитета, воспаления и ХСН двояка. С одной стороны, воспаление способствует структурным изменениям сердца (прямое негативное влияние на сократимость, развитие гипертрофии и фиброза миокарда, нарушение митохондриальной генерации энергии, апоптоз, развитие эндотелиальной дисфункции и тромбофилии). С другой — гиперцитокинемия, свойственная ХСН, пролонгирует срок жизни лейкоцитов (нейтрофилов) в сосудистой стенке, увеличивая тем самым величину ЛВСЛ и продукцию ряда белков. Этот факт объясняет наличие корреляции тяжести ХСН и величины ЛВСЛ.

На основании проведенного анализа научной литературы и собственных данных предложена концепция дезадаптации механизмов воспаления и врожденного иммунитета у больных атеросклерозом, состоящая в том, что процесс формирования атеросклеротических поражений следует рассматривать как измененную активность механизмов, связанных с эволюционно сформированной системой белковой продукции лейкоцитами, в первую очередь нейтрофилами, выступающей как компонент ограничения и уничтожения чужеродных антигенов. В ответ на типоспецифическую стимуляцию различными факторами, такими как окисленные липиды, компоненты клеточных стенок микробных агентов, происходит активация toll-like и других распознающих рецепторов системы врожденного иммунитета [18], имеющих на мембранах нейтрофилов, последними запускаются механизмы продукции ряда белково-пептидных агентов, например дефензинов-альфа и СРБ. Процесс высвобождения нейтрофилами белков регулируется также опосредованно через взаимодействие с другими клетками. Часть высвобождаемых белково-пептидных факторов синтезируются непосредственно нейтрофилами (дефензины-альфа, ВПф, СРБ), другие накапливаются в цитоплазме последних в ходе процесса интернизации, то есть прижизненного обмена клеточными компартментами с другими клетками [15]. Действие каждого из высвобождаемых факторов направлено на отграничение чужеродного агента путем его непосредственного уничтожения (СРБ и дефензины-альфа), ограничения регионального кровотока — тромбоза (ВПф, ЛПА) или путем активации неоангиогенеза (ЛПА). Однако генетически предопределенная система реагирования на вторжение чужеродных агентов в условиях постоянной стимуляции (дислипидемия, АГ и другие факторы) носит дезадаптивный характер и способствует атерогенезу.

Таким образом, величина ЛВСЛ, содержание СРБ и дефензинов-альфа в лейкоцитарных супернатантах у больных ИБС взаимосвязаны с тяжестью и активностью атеросклеротического поражения артерий, что подтверждается ре-

зультатами обследования больных на этапе доклинического, клинически манифестного стабильного и нестабильного атеросклеротического поражения.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Список литературы

1. Baetta R., Corsini A. Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: Current state and future perspectives. *Atherosclerosis* 2010; 210 (1): 1–13. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.028.
2. van Leeuwen M., Gijbels M. J., Duijvestijn A., et al. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 84–89. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.154807.
3. Zernecke A., Bot I., Djalali-Talab Y., et al. Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res* 2008; 102: 209–217. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.160697.
4. Weber C., Zernecke A., Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 802–815. DOI: 10.1038/nri2415.
5. Higazi A., Nassar T., Ganz T., Rader D., et al. The alpha-defensins stimulate proteoglycan-dependent catabolism of low-density lipoprotein by vascular cells: a new class of inflammatory apolipoprotein and a possible contributor to atherogenesis. *Blood* 2000; 96 (4): 1393–8. PMID: 10942383.
6. Mishlanov V. Yu., Tuv A. V., Shutov A. A. i dr. Method lipid-releasing leukocytes ability in the diagnosis of mechanisms atherogenesis in patients with coronary heart disease and cerebral ischemic stroke. *Klin. lab. Diagnostika* 2006; 5: 9–12. Russian (Мишланов В. Ю., Туев А. В., Шутов А. А. и др. Метод липидвысвобождающей способности лейкоцитов в диагностике механизмов атерогенеза у больных ишемической болезнью сердца и мозговым ишемическим инсультом. *Клиническая лабораторная диагностика* 2006; 5: 9–12).
7. Mishlanov V. Yu., Sandakov P. Ya., Vladimirov V. E. i dr. Proteinsynthetic function of neutrophils and lipid-releasing leukocytes ability in patients with atherosclerosis. *Clinical Medicine* 2013; 91 (12): 17–21. Russian (Мишланов В. Ю., Сандаков П. Я., Владимировский В. Е. и др. Протеинсинтезирующая функция нейтрофилов и липидвысвобождающая способность лейкоцитов у больных атеросклерозом / *Клиническая медицина* 2013; 91 (12): 17–21.
8. Burtseva T. V., Mishlanov V. Yu., Tuv A. V. i dr. Levels of serum biomarkers and lipid-releasing leukocytes ability in arterial hypertension and ischemic heart disease with different severity of heart failure. *Vrach-aspirant* 2011; 3 (3): 482–489. Russian (Бурцева Т. В., Мишланов В. Ю., Туев А. В. и др. Показатели сывороточных биомаркеров и липидвысвобождающей способности лейкоцитов при артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца с разной степенью тяжести сердечной недостаточности. *Врач-аспирант* 2011; 3 (3): 482–489).
9. Vladimirov V. E. Protein-producing function of neutrophils in patients with coronary atherosclerosis. *Modern problems of science and education* 2015; 1: URL: www.science-education.ru/121-17420 Russian (Владимировский В. Е. Белокпродуцирующая функция нейтрофилов у больных коронарным атеросклерозом. *Современные проблемы науки и образования* 2015; № 1: URL: www.science-education.ru/121-17420).
10. Blidberg K I., Palmberg L., Dahlén B., et al. Chemokine release by neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Innate Immun* 2012; 18 (3): 503–10. doi: 10.1177/1753425911423270.
11. Rudolf J., Lewandowski B. Cholesterol, Lipoproteins, High-sensitivity C-reactive Protein, and Other Risk Factors for Atherosclerosis. *Clinics in Laboratory Medicine* 2014; 34: 113–127. DOI: 10.1016/j.cll.2013.11.003.
12. Nassar H., Lavi E., Akkawi Sa'ed, Bdeir K. et al. α-Defensin: Link between inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007; 194: 452–457. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.046.
13. Schoneveld Michelle A. H., Hofer I., Slijter J. P. G., et al. Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness. *Atherosclerosis* 2008; 197 (1): 95–104.
14. Nordestgaard B. J., Chapman M. J., Ray K. Lipoprotein (a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* 2010; 31: 2844–2853. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq386.
15. Silveira A., Scanavini D., Boquist S. et al. Relationships of plasma factor VI-la-fibrinolytic complexes to manifest and future cardiovascular disease. *Thrombosis Research* 2012; 130: 221–225. DOI: 10.1016/j.thromres.2011.08.02.
16. Haider DG, Leuchten N., Schaller G. et al. C-reactive protein is expressed and secreted by peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2006; 146 (3): 533–539. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03224.
17. Frantz S., Bauersachs J., Kelly R. Innate immunity and the heart, 2005. *Current Pharmaceutical Design* 2005; 11: 1279–1290. DOI: 10.2174/138161205307512.
18. Moreno J. A., Ortega-Gomez A., Delbosc S. In vitro and in vivo evidence for the role of elastase shedding of CD 163 in human atherothrombosis. *Eur Heart J* 2012; 33: 252–263. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr123.

К вопросу о важности правильной интерпретации общего анализа крови

Н. А. Соколова, к.м.н., доцент кафедры¹

М. И. Савина, д.б.н., проф. кафедры¹

О. С. Шохина, зав. клинико-диагностической лабораторией²

¹Кафедра клинической лабораторной диагностики факультета дополнительного постдипломного образования ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, г. Москва

²ГБУЗ «Детская городская поликлиника № 7» Департамента здравоохранения г. Москвы

On importance of correct interpretation of complete blood count

N.A. Sokolova, M.I. Savina, O.S. Shokhina

Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov, City Children's Polyclinic No. 7; Moscow, Russia

Резюме

Рассмотрен клинический случай выявления острого лимфобластного лейкоза у ребенка 2 лет 11 месяцев, у которого наблюдалась нейтропения в течение 5 месяцев, и он получал противовирусную терапию. На конкретном примере показана важность правильной и своевременной интерпретации показателей общего анализа крови, особенно числа нейтрофилов.

Ключевые слова: общий анализ крови, нейтропения, анемия, тромбоцитопения, острый лимфобластный лейкоз, интерпретация результатов общего анализа крови.

Summary

We would like to present the case the manifestation of acute lymphoblastic leukemia in 2-year-old and 11-month child was treated with antiviral therapy during several month. We retrospectively analyzed hemogram's values of the child and the importance of correct and timely interpretation of complete blood count is once again evidently demonstrated.

Key words: hemogram, anemia, thrombocytopenia, neutropenia, acute lymphoblastic leukemia, interpretation of complete blood count.

Клинический (общий) анализ крови — это один из самых распространенных рутинных лабораторных тестов в настоящее время. Изменения показателей общего анализа крови (ОАК) часто бывают неспецифичны, но в большинстве случаев играют важную роль, служат отправной точкой в диагностике большинства гематологических заболеваний.

При интерпретации результатов исследования на первом этапе необходимо сопоставить полученные данные для каждого показателя ОАК с референсными диапазонами с учетом пола и возраста больного. Ряд сложностей возникают при интерпретации изменений лейкоцитарной формулы. В настоящее время лейкоцитарная формула может быть подсчитана методом световой микроскопии окрашенных по Романовскому-Гимзе мазков периферической крови или в автоматическом режиме при использовании методов лазерного светорассеяния, цитохимических и других, что позволяет дифференцировать лейкоциты на пять и более популяций. Результаты, которые получает врач-клиницист, всегда представлены в виде процентного содержания различных видов лейкоцитов, а также часто в виде абсолютного их числа. Обращать внимание в первую очередь необходимо на абсолютное содержание клеток, а изменения относительных величин популяций лейкоцитов (процент) не всегда идут параллельно с изменением их концентрации в единице объема крови.

В случае если абсолютное число популяций лейкоцитов не определено гематологическим анализатором, то его легко рассчитать. Например, если концентрация лейкоцитов у пациента $9,3 \times 10^9/\text{л}$, палочкоядерные нейтрофилы

составили 4%, сегментоядерные — 60%, то абсолютное содержание нейтрофилов рассчитывается следующим образом: $64\% \times 9,3 \times 10^9/100\% = 5,95 \times 10^9/\text{л}$.

Онкогематологические заболевания чаще всего до момента клинической манифестации протекают латентно, с минимальным набором клинических проявлений, значительное количество которых неспецифично и может маскироваться у взрослых пациентов симптомами хронических соматических заболеваний. Подходы для ранней диагностики гемобластозов до момента появления специфических жалоб у пациента не разработаны. В настоящее время остается актуальным высказывание И. А. Кассирского: «Правильный учет гемограммы помогает разобраться в сложной диагностической обстановке и, напротив, — недооценка картины крови приводит к частым диагностическим ошибкам» [2]. Чрезвычайно важно сопоставлять клиническую картину заболевания и картину периферической крови, обязательно в рамках дифференциальной диагностики, не отдавая излишнего предпочтения часто встречающимся нозологиям (инфекционные и аллергические заболевания, железодефицитная анемия и т. д.).

Рассмотрим клинический случай, наглядно демонстрирующий необходимость своевременной правильной оценки изменений в ОАК.

Клиническое наблюдение

Anamnesis vitae пациента Б. Пациент Б. родился 13.01.2016 от пятой беременности, четвертых родов. Трое первых родов завершились рождением здоровых детей,

четвертая беременность была замершая. Четвертые роды были своевременными в головном предлежании в 39 недель и 2 дня. Рост ребенка при рождении составил 51 см, вес — 3150 г, оценили по шкале Апгар 8 / 9 баллов. Раннее развитие соответствовало возрасту, ходить самостоятельно начал с 10 месяцев, первые слова сказал в 12 месяцев. Ребенок был на искусственном вскармливании.

Anamnesis morbi пациента Б.

В июле 2018 года ребенок Б. в возрасте 2 лет 6 месяцев проходил плановое обследование перед проведением вакцинации, в которое входит выполнение ОАК.

ОАК от 12.07.2018 (исследование было выполнено с помощью 3-diff-гематологического анализатора и методом световой микроскопии окрашенных мазков периферической крови):

- гемоглобин — 129 г/л;
- эритроциты — $5,41 \times 10^{12}/л$;
- гематокрит — 39,8 %;
- MCH = 23,8 пг (26–32 пг);
- MCHC = 324 г/л (300–380 г/л);
- MCV = 74 фл (80–95 фл);
- RDW — 13,6 % (11,5–14,5 %);
- лейкоциты — $4,8 \times 10^9/л$;
- тромбоциты — $217 \times 10^9/л$;
- СОЭ — 5 мм/ч (выполнено микрометодом Панченкова);
- палочкоядерные нейтрофилы — 1 %;
- сегментоядерные нейтрофилы — 20 %;
- эозинофилы — 3 %;
- лимфоциты — 71 %;
- моноциты — 5 %.

Врач клинической лабораторной диагностики уведомил лечащего врача о наличии у пациента нейтропении — абсолютное число нейтрофилов составило $1 \times 10^9/л$. Основная функция нейтрофилов — борьба с микроорганизмами путем фагоцитоза, также они участвуют в воспалительной реакции, продуцируя целый ряд цитокинов, например, интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли-α. Фактически данные клетки представляют собой первую линию защиты от повреждающих организм агентов [1]. При снижении числа нейтрофилов увеличивается риск развития в первую очередь бактериальных инфекций [1]. Классическое определение нейтропении — это состояние, при котором наблюдается снижение абсолютного числа нейтрофилов до $1,5 \times 10^9/л$ и менее у детей старше 1 года и взрослых [1, 6]. Согласно другим авторам, нейтропения — снижение абсолютного числа нейтрофилов менее $1,1 \times 10^9/л$ у детей старше 1 года [3]. В рассматриваемом случае у ребенка, какими бы критериями мы ни руководствовались, была выявлена бессимптомная нейтропения. Однако на снижение числа нейтрофилов педиатр внимания не обратила, вакцинация была проведена, повторный ОАК не был рекомендован. Если обратиться к клиническим рекомендациям, то в федеральных рекомендациях по диагностике и лечению детей с врожденной нейтропенией есть указание, что если нейтропения выявлена на фоне инфекционного заболевания, необходимо повторить клинический анализ крови дважды, через 1 и 2 недели после

выздоровления от инфекции [5]. В данном случае инфекционного заболевания не было, что тем более требовало уточнения причин появления нейтропении и исключения случайной ошибки в ходе выполнения ОАК.

Начиная с сентября 2018 года ребенок Б. часто болеет инфекционно-воспалительными заболеваниями. В сентябре зарегистрирована лейкопения за счет нейтропении в ОАК. Педиатром начат поиск причин нейтропении. Нейтропении развиваются часто на фоне инфекционных заболеваний, опухолей, вытесняющих нормальные ростки кроветворения, при появлении аутоантител к нейтрофилам (первичная аутоиммунная нейтропения или вторичная [на фоне системных заболеваний соединительной ткани], при иммунодефицитных заболеваниях, мегалобластной анемии и дефиците меди [1]. В ходе проведения молекулярно-генетических исследований у пациента Б. в октябре 2018 года выявлена герпетическая инфекция (результаты анализа: цитомегаловирус — 0 копий/мл, вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) — 0 копий/мл, вирус герпеса человека шестого типа — 360 копий/мл. Действительно, наиболее частой причиной нейтропений являются вирусные инфекции (особенно возбудители: цитомегаловирус, ВЭБ, вирус иммунодефицита человека, парвовирус). Были выполнены ряд биохимических и иммунологических исследований, в ходе которых выявлено только увеличение уровня С-реактивного белка до 8,9 мг/л. Клинико-лабораторных данных в пользу аутоиммунной патологии получено не было. Обращает на себя внимание ОАК от 27.11.2018:

- гемоглобин — 117 г/л;
- эритроциты — $4,25 \times 10^{12}/л$;
- гематокрит — 34,5 %;
- MCH = 27,5 пг (26–32 пг);
- MCHC = 339 г/л (300–380 г/л);
- MCV = 81 фл (80–95 фл);
- RDW — 15,2 % (11,5–14,5 %);
- лейкоциты — $3,2 \times 10^9/л$;
- тромбоциты — $156 \times 10^9/л$;
- СОЭ — 16 мм/ч (выполнено микрометодом Панченкова).

У пациента имеется трехростковая цитопения и зарегистрирована абсолютная нейтропения — уровень нейтрофилов составил $0,1 \times 10^9/л$, то есть состояние агранулоцитоза. Агранулоцитоз — жизнеугрожающее состояние, которое диагностируется при снижении абсолютного числа нейтрофилов ниже $0,5 \times 10^9/л$ [1]. Педиатр направляет пациента Б. на консультацию к гематологу. В ходе осмотра 03.12.18 гематолог выявил увеличение печени на 1 см ниже края реберной дуги. По результатам обследования был поставлен диагноз «D 70 — агранулоцитоз. Лейко-нейтропения. Смешанная герпетическая инфекция: ВЭБ, герпес шестого типа». Назначены противовирусная терапия, ультразвуковое исследование органов брюшной полости, почек, тимуса, ОАК один раз в неделю. При ультразвуковом исследовании обнаружено увеличение селезенки, значительное усиление сосудистого рисунка печени.

08.12.18 и 09.12.10 у пациента Б. отмечались рвота, диарея, подъем температуры до 37,5 °С. Педиатр рекомендовала повторную консультацию у гематолога. В ОАК от 10.12.18

нарастание анемии (гемоглобин — 103 г/л), тромбоцитопении ($123 \times 10^9/\text{л}$) и абсолютное число нейтрофилов — $0,06 \times 10^9/\text{л}$. По результатам обследования от 11.12.18 гематологом рекомендовано продолжить противовирусную терапию, при дальнейшей отрицательной динамике исследовать уровень антител к нейтрофилам, при ухудшении состояния показана госпитализация в стационар. Мамой ребенка 15.12.18 обнаружена опухоль за правым ухом. При осмотре педиатром выявлено увеличение заушного лимфатического узла справа. По данным ультразвукового исследования отмечены гепатоспленомегалия, лимфаденит правого заушного лимфатического узла с нарушением дифференцировки его структуры. Педиатр выдал направление на госпитализацию в стационар. Однако родители продолжили лечение на дому. 18.12.18 у ребенка *Б.* наблюдается подъем температуры тела до $38,5^\circ\text{C}$ без катаральных явлений, родителями было начато самостоятельно лечение цефиксимом. Ухудшение состояния пациента *Б.* 21.12.18, ребенок был доставлен бригадой скорой медицинской помощи в приемное отделение стационара и сразу госпитализирован в гематологическое отделение. Пациенту была выполнена костномозговая пункция, в миелограмме было обнаружено 94% бластов. После проведения ряда уточняющих исследований был выставлен клинический диагноз «острый лимфобластный лейкоз, иммуновариант В-П, гиперплоидный клон с трисомией 4, 10, 17. ЦНС статус 1. Первый острый период от 12.18». Начато соответствующее варианту острого лейкоза лечение.

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) составляет около 25% случаев от всех злокачественных опухолей у больных в возрасте до 18 лет и является самым частым онкологическим заболеванием детского возраста. Заболеваемость составляет около 4 новых случаев на 100 тысяч детей в год [4]. Пик заболеваемости ОЛЛ у детей приходится на дошкольный возраст (2–5 лет при медиане 4,7 года). Несколько чаще болеют мальчики — 1,4:1 [4]. Длительность анамнеза заболевания от момента появления первых клинических признаков до морфологической верификации диагноза составляет от нескольких недель до нескольких месяцев. Наиболее частые проявления ОЛЛ: анемия, геморрагический синдром и развитие инфекций различной степени тяжести; наличие опухолевой массы в виде органомегалии, большого количества опухолевых клеток в периферической крови, лимфоаденопатии и масс в средостении; в некоторых случаях развивается болевой синдром, связанный с поражением костей, появлением клинических признаков поражения ЦНС и поражением кожи [4].

Ретроспективный анализ клинико-лабораторных данных пациента *Б.* показывает, что первые признаки заболевания в виде нейтропении появились еще в июле 2018 года. Ребенок входил в группу, для которой отмечена самая высокая частота встречаемости ОЛЛ в детском возрасте, — ему было 2,5 года, ребенок мужского пола. На первом этапе активного обследования пациента осенью 2018 года совершенно верно были включены в круг дифференциальной диагностики инфекционные и ауто-

иммунные заболевания, но недостаточно внимания было уделено возможности развития у него неоплазий. Согласно клиническим рекомендациям дифференциальную диагностику ОЛЛ рекомендуется проводить с инфекциями прежде всего вирусной этиологии (инфекционный мононуклеоз, цитомегаловирусная инфекция, парвовирусная [В 19], аденовирусная), а также с бактериальной (токсоплазмоз), затем с неоплазиями в костном мозге (острый миелобластный лейкоз, лимфомы, миелодисплазии), с метастатическими поражениями костного мозга (нейробластома, рабдомиосаркома, саркома Юинга) с аутоиммунными и ревматологическими заболеваниями (ревматоидный артрит, системная красная волчанка) [4]. Эти положения следует учитывать и при рассмотрении причин цитопений, какую бы этиологию данных состояний мы ни ставили во главе диагностического поиска.

При анализе причин нейтропении, двух- или трехкратной цитопении обязательно должна быть онконастороженность. В круг дифференциальной диагностики у детей обязательно следует включать острые лейкозы. Врачам клинической лабораторной диагностики необходимо внимательно исследовать окрашенные мазки периферической крови в подобных случаях, поскольку чрезвычайно важно не пропустить бласты при подсчете лейкоцитарной формулы. Следует помнить, что обычно при остром лейкозе число лейкоцитов снижено или находится в пределах референтных значений, а число бластных клеток не обязательно велико.

Изменения в ОАК крови не позволяют точно поставить диагноз того или иного заболевания, но всегда свидетельствуют о наличии патологии. При выявлении отклонений показателей в ОАК от референтных значений следует проанализировать возможные причины для конкретного пациента и продумать дальнейший план клинико-лабораторного обследования с учетом возможности установления этиологии обнаруженных изменений. Следует всегда помнить, что «нельзя трактовать реакции крови в отрыве от клиники; динамика этих реакций изменчива вместе с клиническим течением болезни...» [2].

Список литературы

1. Гематология / онкология детского возраста (под ред. А. Г. Румянцев, Е. В. Самочатовой). — М.: ИД Медпрактика-М. — 2004. — 792 с.
2. Кассирский И. А., Алексеев Г. А. Клиническая гематология. М.: Государственное издательство медицинской литературы. — 1962. — 811 с.
3. Мельничук О. С. Показатели гемограммы и сывороточные маркеры воспаления при фебрильных инфекциях у детей: дис...к.м.н. 14.03.10. — ФГБНУ «Научный центр здоровья детей». — М. — 2014. — 96 с.
4. Румянцев А. Г., Масчан А. А., Румянцева Ю. В., Карачунский А. И. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению острого лимфобластного лейкоза у детей и подростков. [Электронный ресурс]. — 2015. — Режим доступа: nodgo.org/sites/default/files/20.%20ОЛЛ.pdf. — 03.04.2019.
5. Румянцев А. Г., Масчан А. А., Шербина А. Ю. Федеральные рекомендации по диагностике и лечению детей с врожденной нейтропенией. [Электронный ресурс]. — Москва. — 2015. Режим доступа: nodgo.org/sites/default/files/10.%20Врожд%20нейтропения.pdf. — 03.04.2019.
6. David C. Dale, Audrey Anna Bolyard An update on the diagnosis and treatment of chronic idiopathic neutropenia // *Curr Opin Hematol.* — 2017. — Vol. 24. — № 1. — p. 46–53.

Ретроспективное определение референсных интервалов тиреотропного гормона для российской популяции

А. Ю. Ольховик, рук. проектов¹

Д. А. Павлов, к.б.н., н.с. ^{2,3}

А. В. Васильев, рук. отдела контроля качества лабораторных исследований¹

П. С. Садовников, рук. проектов¹

В. Л. Эмануэль, д.м.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины⁴

¹ Лабораторная служба ООО НПФ «Хеликс», г. Санкт-Петербург

² GIGA-Neurosciences, Льежский университет, г. Льеж (Бельгия)

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

⁴ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Retrospective determination of reference intervals of thyroid-stimulating hormone for Russian population

A. Yu. Olkhovik, D. A. Pavlov, A. V. Vasilyev, P. S. Sadovnikov, V. L. Emanuel

Helix Laboratory Services, Saint-Petersburg, Russia; GIGA-Neurosciences, University of Liège, Liège, Belgium; Moscow State University n.a. M. V. Lomonosov, Moscow, Russia; First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, Saint Petersburg, Russia

Резюме

Среди всех гормональных исследований тиреотропный гормон (ТТГ) остается самым часто отклоняющимся от референсных интервалов (РИ), несмотря на то что аналитические характеристики методов оценки его концентрации год от года совершенствуются, а функциональная чувствительность каждой последующей генерации по отношению к предыдущей улучшается. На текущий момент консенсус относительно клинически обоснованной границы верхнего значения ТТГ для здоровых людей в мировом сообществе отсутствует и, по сути, текущий РИ объединяет два диапазона: зону практически «полного благополучия» (0,4–2,5 мкМЕ/мл) и зону латентной патологии и (или) «высоко нормальные» значения (2,5–4,0 [5,0] мкМЕ/мл). Учитывая тот факт, что каждая лаборатория должна сама определить РИ для измеряемых аналитов, исходя из особенностей обследуемого контингента, характеристик используемых аналитических систем, достижения необходимой диагностической эффективности методики, собственных практических и экономических возможностей, целью данной работы явилось ретроспективное определение РИ ТТГ для российской популяции на основании анализа 400394 заказов, включающих ТТГ, произведенных в течение года наблюдений. Последовательное усложнение критериев исключения и алгоритмов расчета позволило условно выделить семь анализируемых групп и этапов определения РИ, по итогам каждого из которых были определены промежуточные и итоговые результаты исследования.

Ключевые слова: тиреотропный гормон, референсные интервалы, референсные значения, популяционные различия.

Summary

Among all hormonal studies, thyroid-stimulating hormone (TSH) remains the most often deviating from reference intervals (RI), despite the fact that the analytical characteristics of methods for assessing its concentration are improved from year to year, and the functional sensitivity of each subsequent generation is improved compared to the previous one. Currently, there is no consensus in the world community on the clinically justified limit of the upper TSH value for healthy people and, in fact, the current RI combines two ranges: the zone of almost 'complete well-being' (0.4–2.5 μ MU/ml) and the one of latent pathology and/or 'highly normal' values (2.5–4.0 [5.0] μ MU/ml). Considering the fact that each laboratory should determine the RI for measured analytes on the basis of the characteristics of the examined population, the characteristics of the used analytical systems, the achievement of the necessary diagnostic efficiency of the technique, its own practical and economic possibilities, the aim of this work was to retrospectively determine the TSH RI for the Russian population based on the analysis of 400394 orders, including TSH, made during one year of observation. Consistent complication of exclusion criteria and calculation algorithms allowed to conditionally distinguish seven analyzed groups and stages of determining RI, based on the results of each of which intermediate and final results of the study were determined.

Key words: thyroid-stimulating hormone, reference ranges, reference values, ethnic differences.

Введение

Определение уровня тиреотропного гормона (ТТГ) рассматривается как наиболее чувствительный тест для оценки продукции гормонов щитовидной железы (ЩЖ) и качества компенсации первичного гипотиреоза [1].

При интерпретации результатов количественных исследований клиницисты, а равно и специалисты лабораторий, чаще всего прибегают к оценке

соответствия результата референсным интервалам (РИ). При этом каждая лаборатория должна сама определить их для измеряемых аналитов, исходя из особенностей обследуемого контингента, характеристик используемых аналитических систем, достижения необходимой диагностической эффективности методики, собственных практических и экономических возможностей [2].

Однако ввиду проблем организационно-экономического характера подавляющее большинство лабораторий на практике используют данные литературы и рекомендации производителей оборудования в качестве своих РИ. При этом ТТГ остается самым часто отклоняющимся от РИ среди всех гормональных исследований, несмотря на то что аналитические характерис-

тики методов оценки его концентрации год от года совершенствуются, при этом функциональная чувствительность каждой последующей генерации по сравнению с предыдущим поколением тестов улучшается [3].

На текущий момент консенсус относительно клинически обоснованной границы верхнего значения ТТГ для здоровых людей в мировом сообществе отсутствует [4–7]. В целом характер распределения концентрации ТТГ среди здорового населения в разных ретроспективных исследованиях остается практически одинаковым [8–10] и ненормально распределенным. Характерно, что в область относительно высоких значений РИ (свыше 2,5 мкМЕ/мл) попадает лишь незначительная часть выборки — от 5 до 15% [8, 11, 12], однако их отнесение к группе больных гипотиреозом приведет к колоссальным финансовым затратам, а также к эмоционально-личностным расстройствам у этих людей.

При исключении из общей выборки лиц, которые являются носителями антител к гормонам ЩЖ, у которых определяется зоб или есть ближайшие родственники с патологией ЩЖ, оказывается, что у 95% пациентов полученной выборки уровень ТТГ не превышает 2,5–3,0 мкМЕ/мл. Снижение верхнего порога нормы ТТГ предлагалось неоднократно различными исследованиями с начала 2000-х годов: до 2,12 мкМЕ/мл, по данным SHIP-1 [12]; до 2,5 мкМЕ/мл, по данным NHANES III [13]; до 3,0 МЕ/л, по данным Американской ассоциации клинических эндокринологов [14].

Дополнительно к этому свой вклад в неопределенность вносят индивидуальная биологическая вариация ТТГ, различие подходов к методам и анализу данных для расчета РИ (начиная от различий подходов *a priori* и *a posteriori*, заканчивая используемыми математическими алгоритмами и критериям исключения), а также тот факт, что установочная точка уровня ТТГ по отношению к уровню свободного тироксина (св. Т4) у каждого человека своя [15]. Индивидуальная биологическая вариация для ТТГ в сыворотке определена на уровне 19,3%,

в плазме — 29,3%. Биологическая внутригрупповая вариация установлена как 24,6% для сыворотки и 48,4% для плазмы [16].

Целью данной работы является сравнительный анализ результатов ретроспективного определения РИ ТТГ для российской популяции, полученных разными подходами к анализу данных исходно одной выборки пациентов.

Материалы и методы

Анализу подверглись все заказы, выполненные в лабораторной службе «Хеликс» с 1 января по 31 декабря 2017 года включительно, и содержащие исследование уровня ТТГ среди небеременных пациентов старше 18 лет. В дальнейшем для формирования каждой анализируемой выборки последовательно добавлялись новые критерии исключения с последующим расчетом РИ для всех полученных групп и сравнения результатов между собой. Для каждой выборки рассчитывались РИ для групп старше 18, 60 лет и в промежутке от 18 до 60 лет.

Так, в первую анализируемую группу (I) вошли небеременные пациенты старше 18 лет с уровнем бета-ХГЧ менее 5 МЕ/л (при наличии) — 400394 заказа: 57039 мужчин (М) и 343355 женщин (Ж), что позволило дополнительно исключить пациентов, не знающих (не сообщивших) о своей беременности, проводивших хирургический аборт незадолго до проведения исследования, принимающих препараты ХГЧ и потенциально имеющих опухоли, продуцирующие ХГЧ.

Далее к данной выборке был применен алгоритм отсеивания выбросов с использованием метода Хорна и межквартильного размаха Тьюки с преобразованием данных по Боксу-Коксу ($n = 367088$, $M = 52277$, $J = 314811$), что привело к формированию второй анализируемой группы (II). Данный алгоритм будет повторно применяться для каждой анализируемой группы, описанной ниже.

Следующим шагом, дополнительно к предыдущим критериям, были отобраны пациенты, сдававшие ТТГ лишь один раз за 2017 год ($n =$

290614, $M = 44119$, $J = 246495$) — третья группа (III). Это преследовало одновременно две цели. Во-первых, пациент, которому тест повторяется неоднократно, с большей вероятностью окажется болен и будет иметь патологические результаты, вклад которых в расчет мы стараемся минимизировать. Во-вторых, что важнее, повторное включение данных одних и тех же пациентов приведет к превалированию компонента внутрииндивидуальной вариации над межиндивидуальной и в конечном счете к сужению ширины рассчитанного РИ.

По данной выборке строилась корреляционная матрица, объединяющая все показатели, входящие в заказы пациентов. Теснота связи между ними оценивалась с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена при статистической значимости $p < 0,001$, что позволило составить тепловую корреляционную карту. Затем происходило исключение тех результатов ТТГ, коррелированные с которыми лабораторные показатели у конкретных пациентов имели результат, выходящий за текущие РИ этих тестов. При этом не играло роли, попадали ли, собственно, значения исследуемого показателя в его текущий РИ. Например, если уровень общего Т3 значимо коррелирует с уровнем ТТГ, то в случае патологического значения общего Т3 у пациента, его значение ТТГ исключалось из расчета. В то же время при «нормальном» уровне общего Т3 значение ТТГ включалось в расчет независимо от величины. Данный алгоритм применялся последовательно ко всем показателям, которые были включены в корреляционную матрицу. В случае, если у пациента был нестандартный набор тестов, не позволяющий оценить коррелированные аналиты, результат исследуемого показателя включался в выборку и мог быть в дальнейшем исключен лишь как выброс. На основании данных критериев была составлена выборка в размере 196322 уникальных пациентов ($M = 26146$, $J = 170176$), сформировавших четвертую анализируемую группу (IV).

Однако примененный нами ранее

Таблица 1
Результаты референсных интервалов ТТГ (мкМЕ/мл) исследуемых групп

Возраст	18–60			18+			60+		
Пол	М + Ж	М	Ж	М + Ж	М	Ж	М + Ж	М	Ж
I	0,02–10,84	0,02–11,72	0,02–10,73	0,02–12,19	0,02–13,26	0,02–12,03	0,02–16,41	0,01–18,42	0,02–16,14
II	0,46–6,41	0,52–5,70	0,45–6,48	0,43–6,99	0,50–6,33	0,41–7,10	0,30–9,26	0,39–8,71	0,29–9,30
III	0,55–5,30	0,57–4,73	0,54–5,45	0,53–5,74	0,57–5,04	0,52–5,87	0,45–7,58	0,50–6,63	0,44–7,68
IV	0,54–5,08	0,58–4,68	0,53–5,13	0,52–5,49	0,56–5,02	0,51–5,60	0,42–7,28	0,49–6,73	0,41–7,33
V	0,55–4,90	0,58–4,55	0,55–4,95	0,54–5,27	0,58–4,83	0,53–5,32	0,46–6,92	0,51–6,22	0,45–7,01
VI	0,49–4,78	0,52–5,50	0,47–4,66	0,48–4,78	0,42–5,33	0,45–4,64	0,37–4,82	0,42–6,77	0,32–4,71
VII	0,42–2,39	0,68–2,29	0,36–2,40	0,27–2,57	0,16–2,62	0,46–2,52	0,98–2,36	1,18–2,19	–

Примечание. I — небеременные пациенты; старше 18 лет; бета-ХГЧ < 5 МЕ/л (при наличии); n = 400394 М (мужчин) = 57039, Ж (женщин) = 343355. II — группа I + исключение выбросов с использованием метода Хорна и межквартильного размаха Тьюки с преобразованием данных по Боксу-Коксу (n = 367088; М = 52277, Ж = 314811). III — группа I + исключение выбросов + 1 сдача ТТГ в 2017 году (n = 290614; М = 44119, Ж = 246495). IV — группа III + исключение по результатам коррелирующих аналитов (n = 196322; М = 26146, Ж = 170176). V — группа IV + исключение пациентов с повторной сдачей ТТГ в IV квартале 2016-го или I квартале 2018 года (n = 177493; М = 24336, Ж = 153157). VI — небеременные пациенты; старше 18 лет; 1 сдача ТТГ за период с IV квартала 2016-го по I квартал 2018 года включительно; бета-ХГЧ менее 5 МЕ/л (при наличии); анти-ТТГ — в пределах используемого РИ — менее 115 МЕ/мл; анти-ТПО — в пределах используемого РИ — менее 34 МЕ/мл; FT4 — в пределах используемого РИ — 10,8–22,0 пмоль/л; анти-ТТГ — в пределах используемого РИ — менее 1,75 МЕ/л + исключение выбросов + исключение по результатам коррелирующих аналитов (n = 1086; М = 265, Ж = 821). VII — группа VI + использование метода математического разделения смешанных выборок Bhattacharya.

критерий исключения всех пациентов, которым выполняли рассматриваемый тест за охватываемый период более одного раза, несет в себе недостаток пограничных случаев повторной сдачи. Так, по данному критерию в выборку могут войти пациенты, сдавшие ТТГ, например, 30 декабря 2016 года и повторно сдавшие данный тест через месяц уже в 2017 году (без дальнейших повторных сдач в 2017-м). Аналогичный случай может произойти и на стыке 2017 и 2018 годов. Ввиду этого нами дополнительно были отслежены повторные случаи сдачи в IV квартале 2016-го и I квартале 2018 года с последующим исключением данных пациентов из итоговой выборки (n = 177493, М = 24336, Ж = 153157) — пятая группа (V).

Стоит отметить, что доступное нам количество данных позволило параллельно составить шестую группу (VI), наиболее строгую выборку референсной группы пациентов. В нее вошли небеременные пациенты старше 18 лет, сдававшие ТТГ за 2017 год не более одного раза, в заказе которых одновременно с определением уровня ТТГ были получены следующие результаты: бета-ХГЧ менее 5 МЕ/л (при наличии); анти-ТТГ — в пределах используемого РИ — менее 115 МЕ/мл; анти-ТПО — в пределах

используемого РИ — менее 34 МЕ/мл; FT4 — в пределах используемого РИ — 10,8–22,0 пмоль/л; анти-ТТГ — в пределах используемого РИ — менее 1,75 МЕ/л (n = 1086, М = 265, Ж = 821). Подобные методы исключения позволяют отсеять пациентов с возможной скрытой аутоиммунной патологией ЩЖ, что в подобных масштабах сложно реализовать в рамках эксперимента *a priori*.

Дополнительно к этому данные последней описанной группы пациентов позволили провести определение РИ группы пациентов методом Bhattacharya, условно седьмая группа (VII).

Во всех полученных референсных группах был произведен расчет РИ одним из рекомендованных CLSI способов — непараметрическим (с использованием пакета Reference Intervals для R-Studio). Для статистического анализа данных использовались методы описательной статистики, анализа распределений, выборочных сравнений и поиска зависимостей, выполненных в пакетах статистических программ: R 3.3.2 и PAST 3.20.

Выполнение всех исследований проводилось на аналитической системе Roche cobas 8000, модуль e 602. Процедуры внутрилабораторного контроля качества выполнялись в соответствии с требованиями ГОСТ Р

53133.2–2008 [17] с использованием аттестованных контрольных материалов производства Roche Diagnostics и Bio-Rad Laboratories. Внешняя оценка качества подтверждена результатами программ EQAS, межлабораторного сличения UNITY (Bio-Rad Laboratories) и RIQAS (Randox Laboratories). Метрологическая прослеживаемость значений калибраторов — согласно ГОСТ ISO 17511–2011 [18].

Результаты и обсуждение

Референсные интервалы, полученные для каждой анализируемой группы в ходе данного исследования, представлены в табл. 1.

Безусловно, референсные интервалы, определенные в группе I, не несут какой-либо практической ценности (близость верхней границы РИ к принятой границе назначения заместительной терапии левотироксинном скорее случайна) и приведены для сравнения и демонстрации важности использования алгоритмов исключения выбросов при анализе данных, которыми, к сожалению, склонны пренебрегать.

Одно исключение выбросов с использованием метода Хорна и межквартильного размаха Тьюки с преобразованием данных по Боксу-Коксу позволило существенно сузить РИ,

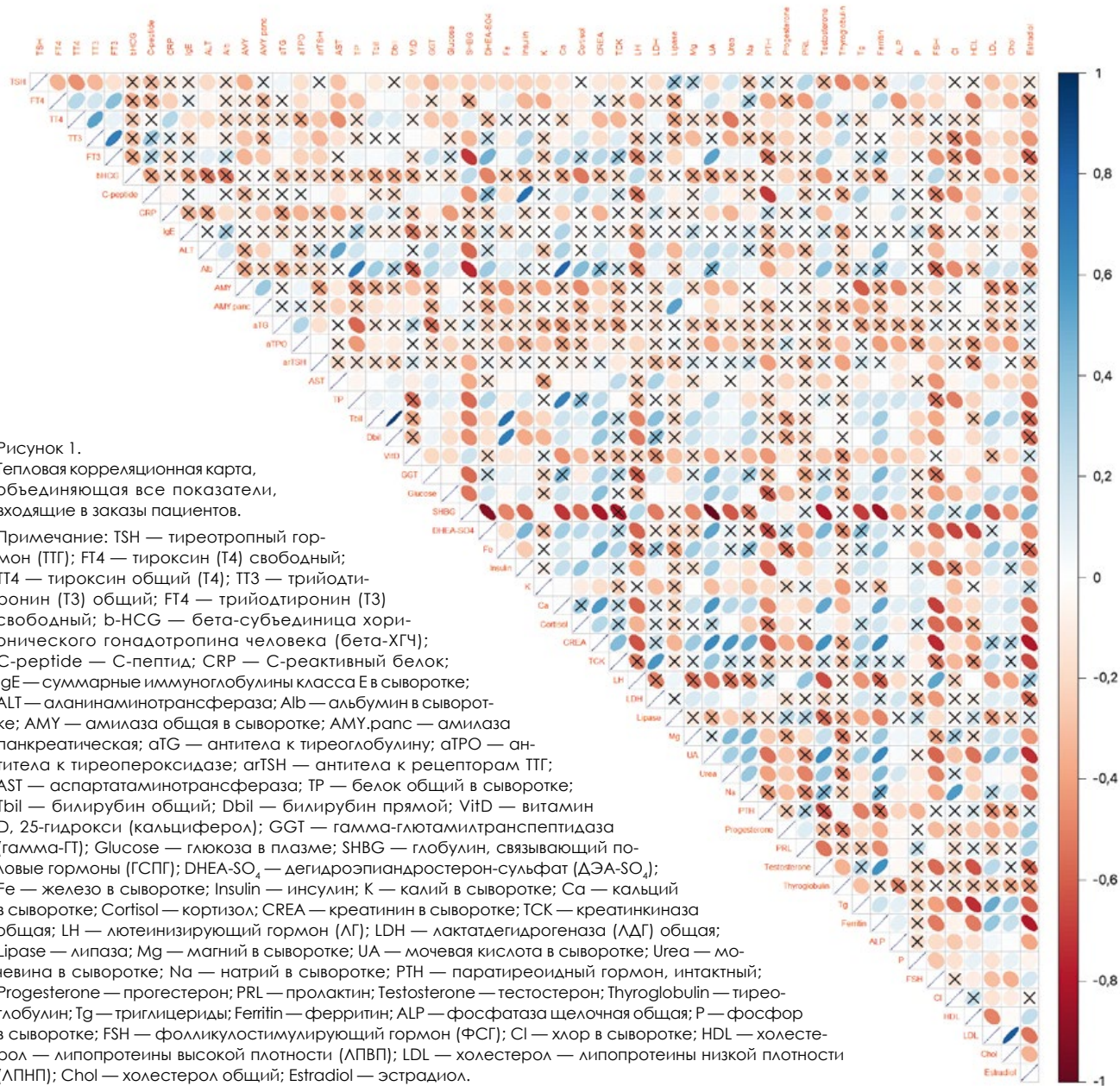


Рисунок 1.
Тепловая корреляционная карта,
объединяющая все показатели,
входящие в заказы пациентов.

Примечание: TSH — тиреотропный гормон (ТТГ); FT4 — тироксин (Т4) свободный; TT4 — тироксин общий (Т4); TT3 — трийодтиронин (Т3) общий; FT4 — трийодтиронин (Т3) свободный; b-HCG — бета-субъединица хорионического гонадотропина человека (бета-ХГЧ); C-peptide — C-пептид; CRP — C-реактивный белок; IgE — суммарные иммуноглобулины класса E в сыворотке; ALT — аланинаминотрансфераза; Alb — альбумин в сыворотке; AMY — амилаза общая в сыворотке; AMY.panc — амилаза панкреатическая; aTG — антитела к тиреоглобулину; aTPO — антитела к тиреопероксидазе; aTSH — антитела к рецепторам ТТГ; AST — аспартатаминотрансфераза; TP — белок общий в сыворотке; Tbil — билирубин общий; Dbil — билирубин прямой; VitD — витамин D, 25-гидрокси (кальциферол); GGT — гамма-глутамилтрансферидаза (гамма-ГТ); Glucose — глюкоза в плазме; SHBG — глобулин, связывающий половые гормоны (ГСПГ); DHEA-SO₄ — дегидроэпиандростерон-сульфат (ДЭА-SO₄); Fe — железо в сыворотке; Insulin — инсулин; K — калий в сыворотке; Ca — кальций в сыворотке; Cortisol — кортизол; CREA — креатинин в сыворотке; TCK — креатинкиназа общая; LH — лютеинизирующий гормон (ЛГ); LDH — лактатдегидрогеназа (ЛДГ) общая; Lipase — липаза; Mg — магний в сыворотке; UA — мочевая кислота в сыворотке; Urea — мочевины в сыворотке; Na — натрий в сыворотке; PTH — паратиреоидный гормон, интактный; Progesterone — прогестерон; PRL — пролактин; Testosterone — тестостерон; Thyroglobulin — тиреоглобулин; Tg — триглицериды; Ferritin — ферритин; ALP — фосфатаза щелочная общая; P — фосфор в сыворотке; FSH — фолликулостимулирующий гормон (ФСГ); Cl — хлор в сыворотке; HDL — холестерол — липопротеины высокой плотности (ЛПВП); LDL — холестерол — липопротеины низкой плотности (ЛПНП); Chol — холестерол общий; Estradiol — эстрадиол.

однако лишь этого критерия исключения явно недостаточно для получения релевантной выборки пациентов.

Первоначальная гипотеза о влиянии повторной сдачи анализа за исследуемый промежуток времени подтвердилась по результатам группы III, что позволило еще раз качественно сузить границу РИ.

Хорошей практикой ретроспективного определения РИ считается учет результатов сопутствующих анализов, которые пациенты сдавали вместе с целевым анализом [19] (рис. 1).

Исключение тех результатов ТТГ, коррелированные с которым тесты у конкретных пациентов имели ре-

зультат, выходящий за их текущие РИ, и дополнительный отсев повторных сдач целевого анализа за квартал до и после анализируемого промежутка времени позволили получить результат ретроспективного определения РИ в виде границ 0,55–4,90 мкМЕ/мл V группы. По сути, алгоритм анализа данных, примененный до данного этапа, является универсальным для ретроспективного определения РИ любого анализа и может быть рекомендован для практического использования.

Полученное распределение ТТГ соответствует данным литературы и также характеризуется ненормаль-

ностью со скошенностью среднего в сторону меньших значений (рис. 2 а). Принято считать, что «высоконормальные» [20, 21] значения обусловлены пациентами со скрытой аутоиммунной патологией [22].

Накопленный клинический опыт и большая выборка пациентов позволяют провести более глубокое вторичное исключение, исключив потенциальное влияние данной группы пациентов на конечный результат. Так, по результатам сопутствующих анализов, мы можем исключить пациентов с аутоиммунной патологией ЩЖ, что на практике не всегда используется даже при прямом определении РИ (рис. 2, 3).

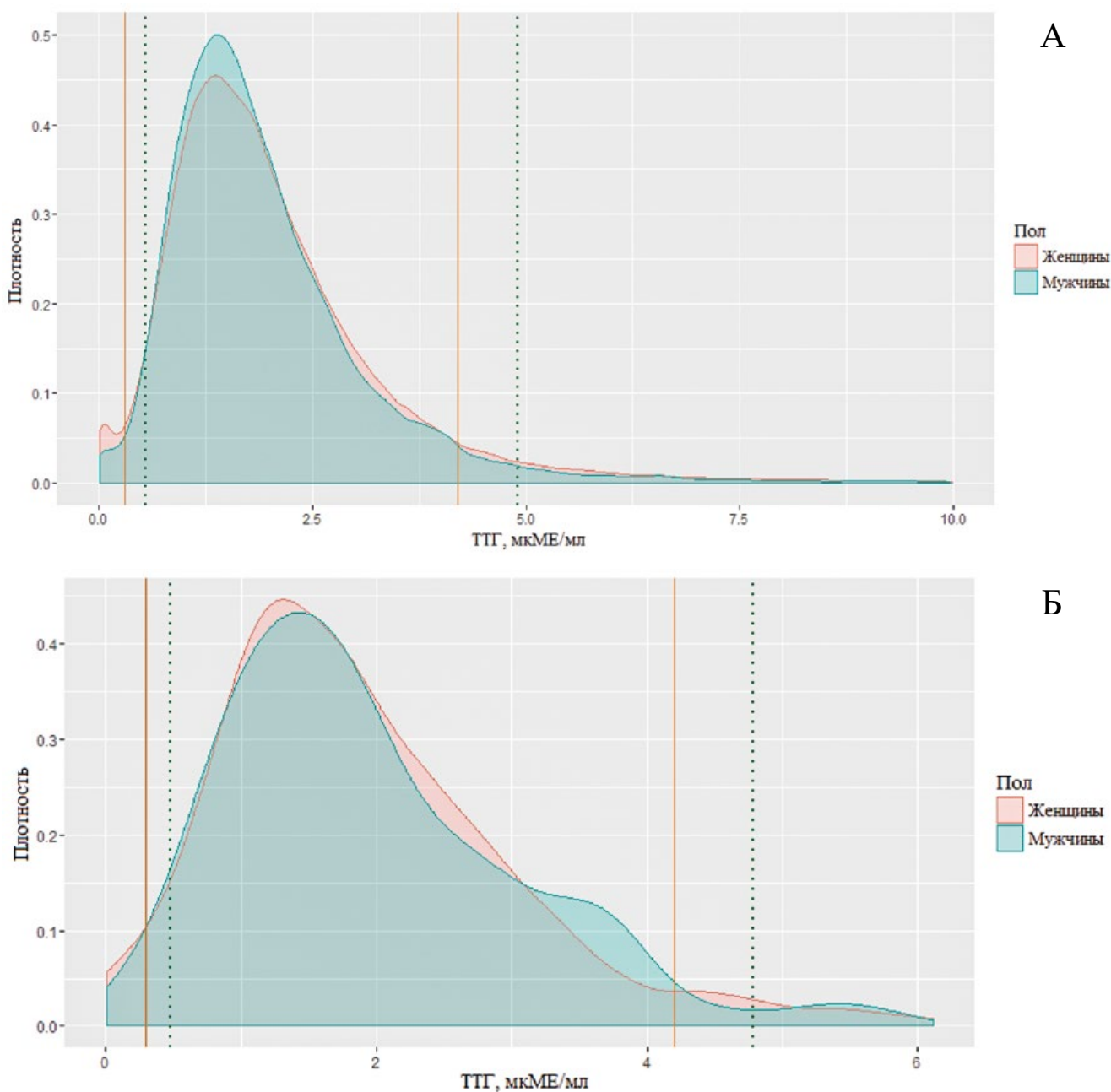


Рисунок 2. Плотность гендерного распределения ТТГ. Сплошная линия — текущий рекомендованный РИ, пунктирная — расчетный РИ по данным настоящего исследования. А — группа V; Б — группа VI.

При сравнении графиков плотности распределения групп V и VI видно, что исключение потенциальной группы пациентов с аутоиммунной патологией не привело к общей нормализации распределения, «высоконормальный» хвост, по сути, остался неизменным, значение РИ сузилось лишь до 0,49–4,78 мкМЕ/мл. Однако мы можем наблюдать исчезновение локального пика распределения до нижней границы РИ. За счет меньшего числа мужчин в выборке, по сравнению с женщи-

нами (рис. 3), график плотности распределения для мужчин в области «высоконормальных» значений не столь плавный.

График эмпирической функции кумулятивного распределения ТТГ для VI группы (рис. 4) позволяет более детально проследить распределение пациентов по соответствующим перцентилям. Так, нельзя сказать, что принятые границы РИ в 2,5 и 97,5 перцентилей соответствуют значимым локальным экстремумам. Относительно резкое увеличение числа

пациентов наблюдается до границы 1 мкМЕ/мл с плавным увеличением вплоть до значений 3,5 мкМЕ/мл, после которого происходит спад. Разницы распределений между полами не обнаружено.

В практике лабораторий также может быть использован расчет РИ по методу Bhattacharya [23]. Этот математико-статистический метод позволяет разделять смешанный массив данных на группы, имеющие нормальные распределения. Гипотетически у здоровых людей разброс

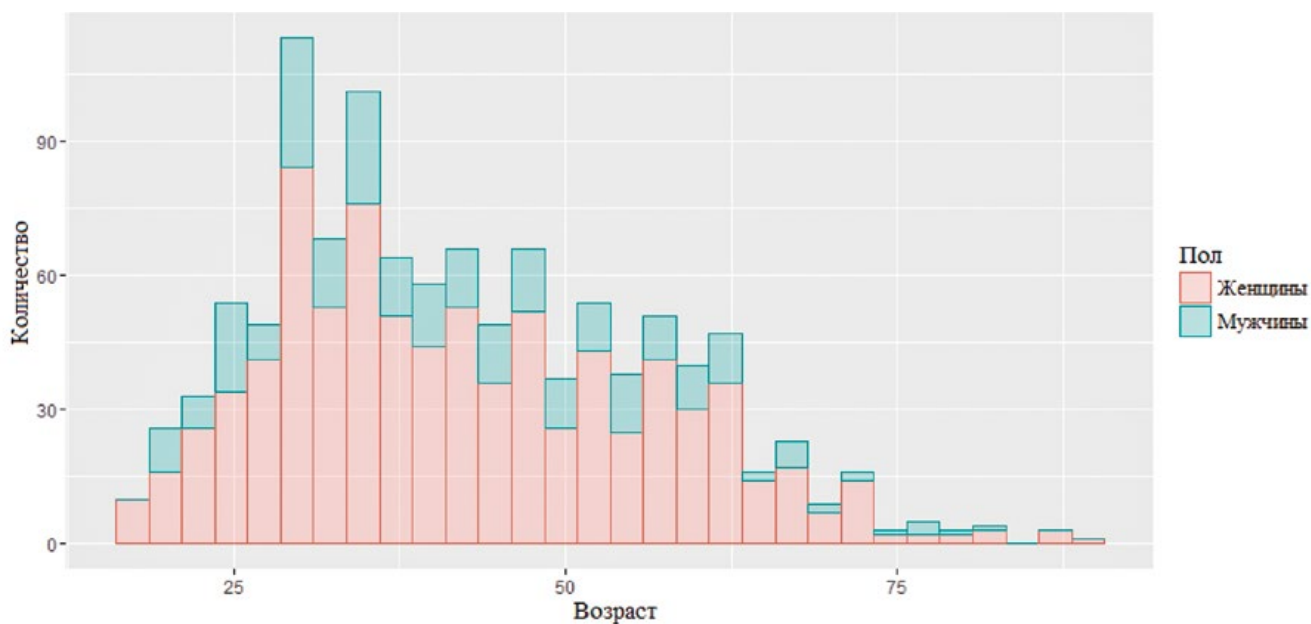


Рисунок 3. Распределение по полу и возрасту шестой анализируемой группы (VI).

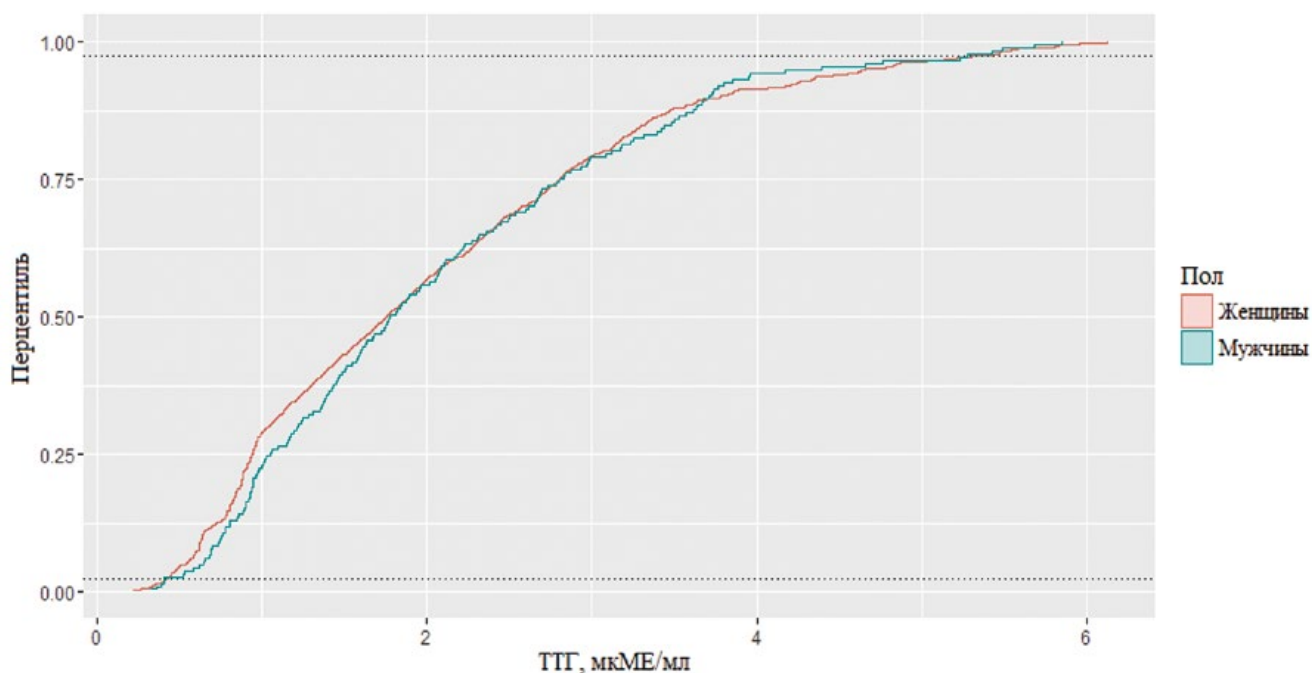


Рисунок 4. Эмпирическая функция кумулятивного распределения ТТГ VI группы. Пунктирные линии соответствуют 2,5 и 97,5 перцентильям, по которым принято устанавливать границы референсного интервала.

значений многих анализов формирует частотное распределение, близкое к нормальному, которое может быть описано с помощью среднего значения и стандартного отклонения. Однако за счет гипотетического присутствия в общей выборке патологических результатов общий вид распределения будет непараметрическим: скошенным или полиномиальным. Данный метод в рамках нашего исследования может быть применен к наиболее жестко ото-

бранной группе пациентов (рис. 5). Примечательно, что ярко выраженной нормально распределенной группы пациентов, покрывающей подавляющее большинство результатов, определить не удалось, однако наиболее близкие из них представлены на рис. 5. Скорее всего именно эти две группы составляют костяк текущих используемых РИ: синяя линия — медиана = 1,41 мкМЕ/мл; SD = 0,503; РИ = 0,42–2,39 мкМЕ/мл, что соответствует одним из наиболее

строгих РИ [13]; красная линия — медиана = 2,71 мкМЕ/мл, SD = 0,41, что соответствует текущим «высоконормальным» значениям.

Стоит отметить, что на определенное смещение РИ в сторону более высоких значений, полученных в данном исследовании, могло оказать влияние тест-систем Roche Diagnostics. Так, содержание ТТГ в образцах пациентов и контрольных материалах, полученное на системах Roche Diagnostics, обычно выше, чем

абсолютные значения, полученные на системах Abbott. Эта особенность была установлена, опираясь на литературные данные [24] и сравнение методов в системах внешней оценки качества. Зависимость референсных интервалов от производителя аналитической системы необходимо учитывать при определении целевых значений при беременности, лечении заболеваний ЩЖ и оценке субклинического гипотиреоза.

Заключение

Проблема определения и валидации РИ известна, а ТТГ является одним из наиболее ярких ее примеров. Текущий уровень обеспечения информационными технологиями лабораторных комплексов и усовершенствованные методы анализа данных позволяют работать с большими объемами данных за продолжительные промежутки времени. Однако ввиду относительно слабой изученности данного вопроса каждый из представленных методов расчета следует валидировать экспериментально. Так, для экспериментального доказательства корректности принципов расчетов следует провести прямое определение РИ методом *a priori* с формированием наиболее строгой выборки пациентов, обязательным предварительным медицинским обследованием и сбором анамнеза. В случае успешного подтверждения описанных методов подобный подход для определения РИ имел бы значительный экономический эффект на систему здравоохранения вследствие оперативного формирования актуализированных клинических рекомендаций. Потенциально подобные принципы могут быть оформлены в официальные валидированные рекомендации и использованы при расчетах и корректировках РИ других анализов.

Список литературы

1. Zimmermann M., Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2015; 3 (4): 286–295. DOI: 10.1016/S2213-8587(14)70225-6.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory* —

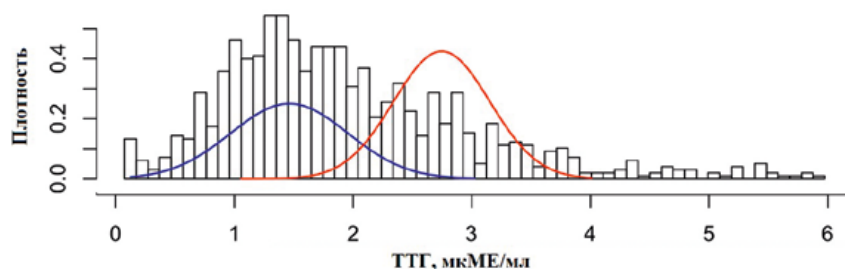


Рисунок 5. Плотность распределения с выделенными нормально распределенными частями по Bhattacharya. Красная линия — «высоконормальные» значения.

- Approved Guideline — Third Edition — CLSI Document EP28-A3c. (ISBN 1-56238-682-4) Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, 19087-1898, USA, 2010.
3. Теряева Н. Б., Мошкин А. В. Граница референсного диапазона ТТГ: многолетняя дискуссия и возможности современной постаналитики. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (11).
 4. Jensen E., Hyltoft Petersen P., Blaabjerg O., Hansen P. S., Brix T. H., Hegedus L. Establishment of a serum thyroid stimulating hormone (TSH) reference interval in health adults. The importance of environmental factors, including thyroid antibodies. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42 (7): 824–832.
 5. Zöphel K., Wunderlich G., Kotzerke J. Should we really determine a reference population for the definition of thyroid-stimulating hormone reference interval. *Clin Chem*. 2006; 52 (2): 329–330.
 6. Fatourehchi V. Editorial: upper limit of normal serum thyroid hormone: a moving and now an aging target? // *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007; 92 (12): 4560–4562.
 7. Farrell C., Nguyen L., Carter A. Data mining for age-related TSH reference intervals in adulthood. *Clinical Chemistry And Laboratory Medicine (CCLM)*. 2017; 55 (10). DOI: 10.1515/cclm-2016-1123.
 8. Surks M. I., Boucai L. Age- and race-based serum thyrotropin reference limits. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(2): 496–502.
 9. Hollowell J. G., Staehling N. W., Flanders W. D., Hannon W. H., Gunter E. W., Spencer C. A., Braverman L. E. Serum TSH T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988–1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 489–99.
 10. Kratzsch J., Fiedler G. M., Leichtle A., Brigel M., Buchbinder S., Otto L. et al. New reference intervals for thyrotropin and thyroid hormones based on National Academy of Clinical Biochemistry criteria and regular ultrasonography of the thyroid. *Clin Chem*. 2005; 51: 1480–1486.
 11. Hamilton T. E., Davis S., Onstad L., Kopecky K. J. Thyrotropin levels in a population with no clinical, autoantibody, or ultrasonographic evidence of thyroid disease; implications for the diagnosis of subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93: 1224–1230.
 12. Völzke H., Alte D., Kohlmann T., Lødemann J., Nauck M., John U., Meng W. Reference intervals of serum thyroid function tests in a previously iodine-deficient area. *Thyroid*. 2005; 15: 279–85.
 13. Baloch Z., Carayon P., Conte-Devoix B., Demers L. M., Feldt-Rasmussen U., Henry J. F. et al. Laboratory medicine practice guidelines: laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid*. 2003; 13: 3–126.
 14. Baskin H. J., Cobin R. H., Duick D. S., Gharib H., Guttler R. B., Kaplan M. M., Segal R. L. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr Pract*. 2002; 8 (6): 457–469.
 15. А. В. Подзолков, В. В. Фадеев. Гипотиреоз, субклинический гипотиреоз, высоконормальный уровень ТТГ. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2009, том 5, № 2.
 16. Desirable Biological Variation Database specifications — Westgard. Retrieved from westgard.com/biobase1.htm.
 17. ГОСТ Р 53133.2–2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов». [Ссылка активна на 16.04.2018]. Доступно по ссылке: docs.cntd.ru/document/1200072567 (11).
 18. ГОСТ ISO 17511–2011 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приспанных калибрам и контрольным материалам». [Ссылка активна на 16.04.2018]. Доступно по ссылке: docs.cntd.ru/document/1200098671 (12).
 19. Grossi, E. The RELAB Project: a new method for the formulation of reference intervals based on current data. / E. Grossi, R. Colombo, S. Cavuta, C. Franzini // *Clin Chem*. 2005; 51: 1232–40. 10.1373/clinchem.2005.047787.
 20. Фадеев В. В. Нормативы уровня ТТГ: нужны ли изменения. *Клиническая тиреоидология*. 2004, 2 (3): 5–9.
 21. Подзолков А. В., Фадеев В. В. Гипотиреоз, субклинический гипотиреоз, высоконормальный уровень ТТГ. *Клиническая и экспериментальная тиреоидология*. 2009; 5 (2): 4–16.
 22. Spencer. Clinical implications of the new TSH reference range. AACC Expert Access. August 15, 2006. aacc.org/events/expert_access/2006/tshrange/pages/default.aspx.
 23. Bhattacharya C. A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components. / C. G. Bhattacharya // *Biometrics*. 1967; 23: 115–35. 10.2307/2528285.
 24. Sarkar R. TSH comparison between chemiluminescence (Architect) and electrochemiluminescence (Cobas) immunoassays: an Indian population perspective. *Indian journal of clinical biochemistry*. 2014; 29 (2): 189–195.

Для цитирования. Ольховик А. Ю., Павлов Д. А., Васильев А. В., Садовников П. С., Эмануэль В. А. Ретроспективное определение референсных интервалов тиреотропного гормона для российской популяции // *Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория»*. — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 71–77.

Роль молекулярно-генетической неинвазивной лабораторной диагностики в профилактике резус-конфликтной беременности

С. В. Хабаров, д.м.н., проф., кафедры акушерства и гинекологии¹, сотрудник кафедры клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии², гл. врач³, заслуженный врач России

О. В. Денисова, к.м.н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии², гл. врач⁴

В. М. Девиченский, д.б.н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии²

¹Медицинский институт ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», г. Тула

²Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА России, г. Москва

³ООО «ВИТРОМЕД», г. Москва

⁴ООО «ДИАЛАБ+», г. Москва

Role of molecular genetic non-invasive laboratory diagnostics in prevention of RH-conflict pregnancy

S. V. Khabarov, O. V. Denisova, V. M. Devichensky

Medical Institute of Tula State University, Tula; Academy of Postgraduate Education of Federal Scientific and Clinical Centre for Specialized Medical Care and Medical Technologies, Moscow; VITROMED Co., Moscow; DIALAB+ Co., Moscow, Russia

Резюме

Обзор посвящен возможностям проведения неинвазивного пренатального определения резус-фактора плода на раннем сроке беременности на основе анализа ДНК плода, циркулирующей в периферической крови беременной женщины. Рассмотрены методические подходы к выделению и анализу внеклеточной фетальной ДНК. Дана оценка медико-экономической эффективности пренатального неинвазивного скрининга резус-фактора плода резус-отрицательным беременным. Обсуждаются возможности, ограничения и перспективы применения молекулярно-генетических неинвазивных лабораторных методов для определения резус-фактора плода.

Ключевые слова: беременность, резус-фактор плода, резус-сенситизация, гемолитическая болезнь плода, диагностика, профилактика, внеклеточная фетальная ДНК, пренатальная диагностика, неинвазивная диагностика, молекулярно-генетическая диагностика.

Summary

The review is devoted to the possibility of non-invasive prenatal determination of the RH-factor of the fetus in early pregnancy based on the analysis of fetal DNA circulating in the peripheral blood of a pregnant woman. Methodical approaches to the isolation and analysis of extracellular fetal DNA are considered. The assessment of medical and economic efficiency of prenatal noninvasive screening of RH-factor of the fetus in RH-negative pregnant women is given. The possibilities, limitations and prospects of using molecular genetic non-invasive laboratory methods to determine the RH-factor of the fetus are discussed.

Key words: pregnancy, fetal RH-factor, RH-sensitization, fetal hemolytic disease, diagnosis, prevention, extracellular fetal DNA, prenatal diagnosis, non-invasive diagnosis, molecular genetic diagnosis.

Иммунологическая несовместимость плода и матери по резус-фактору является основной причиной гемолитической болезни (ГБ) плода и новорожденного. До 95 % всех клинически значимых случаев ГБ обусловлены несовместимостью именно по этому фактору [1, 2].

Резус-фактор крови — это белковый антигенный комплекс на поверхности эритроцитов. В системе резуса различают шесть антигенов. Наиболее иммуногенным является антиген *D*, кодируемый доминантно наследуемым геном, присутствие которого и обуславливает положительный резус-фактор. Около 15 % людей европейской популяции имеют отрицательный резус-фактор (при этом данный показатель варьирует

в различных этнических группах). Практически все они гомозиготны по рецессивной форме антигена *dd* [3]. Лица с положительным, по лабораторным результатам по резус-фактору, имеют или гомозиготный вариант антигена *D* (*DD*) или его гетерозиготную версию (*Dd*) (у представителей негроидной расы распространены другие аллели гена *RHD*, что необходимо учитывать при молекулярной диагностике резус-фактора). В беременности резус-отрицательной женщины резус-положительным плодом возможно развитие иммунного ответа материнского организма на эритроциты плода. Аллоиммунизация против эритроцитарного *D*-антигена является наиболее частой причиной ГБ плода и новорожденного у людей белой расы

и развивается у одной из 20–25 резус-отрицательных беременных, имеющих резус-положительного мужа. Изоиммунизация может наступать в исходе фето-материнской трансфузии как в гестационный период, так и при его завершении. При первой беременности иммунизируются 10 % женщин. Если резус-отрицательная женщина избежала резус-иммунизации после первой беременности, то при последующей беременности резус-положительным плодом риск иммунизации также составляет 10 % [4]. Первичным ответом материнского организма на проникновение чужеродного антигена является образование *IgM*-антител к *D*-антигену. Последующее воздействие приводит к выработке материнского

IgG-антител к D-антигену, единственных из иммуноглобулинов, способных благодаря малому размеру и наличию на плаценте специального рецептора к Fc-фрагменту молекулы IgG проникать трансплацентарно. Повторное поступление в материнский кровоток даже незначительного количества фетальных эритроцитов вызывает быструю и массивную выработку антирезусных IgG-антител. В половине случаев для развития первичного иммунного ответа достаточно попадания 50–75 мл эритроцитов, а для вторичного — 0,1 мл. Период между началом фето-материнской трансфузии и возникновением первичного иммунного ответа пока точно неизвестен ввиду отсутствия чувствительных лабораторных методов, способных уловить малые количества материнских антиэритроцитарных антител. Однако, как правило, проходит от 8–9 недель до полугода, прежде чем в крови матери начнут выявляться антирезус-антитела. Выраженность самой фето-материнской трансфузии и динамика выработки материнских антирезусных антител является индивидуальной особенностью каждой конкретной беременности.

До 60 годов XX века ГБ обуславливала гибель одного из 2 200 новорожденных. Наибольшее влияние на снижение уровня заболеваемости ГБ оказало внедрение профилактических мероприятий, связанных с введением анти-D-иммуноглобулина в период гестации и после родов [5].

В Российской Федерации число беременных женщин с резус-сенситизацией не имеет тенденции к снижению. В год регистрируется более 230 тыс. беременных с отрицательным резус-фактором, что составляет в среднем 13,6% от их общего количества. Частота развития ГБ плода и новорожденного у беременных колеблется от 0,1 до 2,5%, (в 2018 году — 2,22%), не меняясь в течение последних 10 лет. В 2018 году, согласно данным департамента мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения Министерства здравоохранения РФ [6], в России был выявлен 17441 новорожденный с ГБ (11,0 на 1 тыс. родившихся живыми, а среди недоношенных — 19,0 на 1 тыс.). При этом показатели пери-

натальной смертности остаются высокими: всего в 2018 году от ГБ умерло 36 новорожденных, среди родившихся живыми доношенных уровень перинатальной смертности составил 0,006%, среди недоношенных — 0,270%. За последние годы явно не уменьшилась и частота развития резус-иммунизации.

Данная ситуация сформировала необходимость изменения стратегии мониторинга и профилактики резус-конфликта матери и ребенка. Базируясь на последних достижениях науки и на опыте мировой акушерской практики, необходимо включить в алгоритм ведения беременности определение резус-фактора плода на ранних сроках гестации. При этом выбранный диагностический метод должен иметь хорошие аналитические показатели и отличаться высоким уровнем чувствительности и специфичности.

До 80-х годов прошлого века считалось, что ДНК находится лишь в структурах клетки: преимущественно в ее ядре и некоторое количество — в митохондриях, где она выполняет роль носителя генетической информации.

В конце 1990-х годов исследователь Юк Мин Деннис Ло (*Yuk Ming Dennis Lo*) и его коллеги, работавшие в больнице им. Джона Рэдклиффа (Оксфорд, Англия), впервые выделили ДНК плода (*ffDNA* — *fetal free DNA*), извлеченную из венозной крови беременной женщины. В августе 1997 года команда Ло опубликовала свои данные в журнале *Lancet* в статье под названием «Присутствие фетальной ДНК в материнской плазме и сыворотке» (*Presence of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum*) [7]. Открытие явилось стимулом к интенсивному изучению *ffDNA* в качестве возможного субстрата для неинвазивной дородовой диагностики, а результаты привели к разработке клинических тестов, которые позволили получить доступ к генетической информации плода до его рождения без рисков, связанных с инвазивными методами генетического тестирования, потенциально наносящими вред плоду.

На сегодняшний день доказано, что циркулирующая *ffDNA* появляется в маточном кровотоке в исходе апоптоза и некроза ядродержащих клеточных элементов плаценты, со-

зревания эритроцитов и тромбоцитов, активного выделения клетками нуклеиновых кислот во внеклеточное пространство, а также деградации плодовых эритроцитов, проникающих через фето-плацентарный барьер [6, 8]. Количество *ffDNA* составляет от 0,4 до 11,4% от общего объема ДНК плазмы крови. Начиная уже с 5-й недели гестации фетальная внеклеточная ДНК может быть обнаружена в материнском кровотоке и позволяет получить достоверный результат к 7 неделям беременности (более 4%). При этом уровень ее увеличивается на протяжении всего гравидарного периода (на 0,1% в неделю с 10-й по 21-ю неделю беременности и на 1% после 21-й недели гестации), достигая максимума перед родами [8, 9].

Полученные данные обусловили поиск подходов к проведению молекулярно-генетической неинвазивной лабораторной диагностики состояния плода с применением фетального материала, циркулирующего в крови матери.

Первые исследования, направленные на рассмотрение *ffDNA* в материнском кровотоке как метки для неинвазивной пренатальной диагностики, предназначались для выявления фрагментов Y-хромосомы в качестве эмбриональных маркерных белков плода мужского пола в плазме крови беременных женщин с целью антенатального распознавания гендерных поражений [10, 11, 12, 13].

Практически одновременно появились работы, задачей которых являлось выявление последовательностей, кодирующих *RHD* плода, в крови резус-отрицательных беременных женщин [8, 14].

В ноябре 2011 года сформировался новый лабораторный тест НИПТ (неинвазивный пренатальный тест) как метод неинвазивного пренатального обследования с помощью анализа *ffDNA*. Метод получил официальное признание Международной ассоциации по пренатальной диагностике и стал использоваться сначала для детекции болезни Дауна, а затем и трисомий по другим аутосомам. После ряда усовершенствований технология секвенирования ДНК стала использоваться и для определения резус-принадлежности плода [15].

По данным мета-анализа публикаций ведущих акушерских центров, чувствительность методов неинвазивной диагностики резус-фактора плода составляет 98,5%, а специфичность анализа в сертифицированных лабораториях — 96,6%. Однако известно, что примерно у 4% беременных женщин уровень *ffDNA* в периферической крови бывает крайне незначительным и у этих пациенток подобная диагностика при существующих подходах невозможна в принципе [16, 17].

Ведущая причина, по которой специфичность неинвазивной диагностики практически не может достигать 100%, — существование синдрома «исчезающего близнеца» (*vanishing twin*). При выявлении в итоге сонографического исследования в малом сроке гестации (4–5 недель) более одного плодного яйца исходом беременности почти в половине случаев (40,5%) будет появление на свет лишь одного ребенка. При обнаружении двух эмбрионов на более позднем сроке (6–7 недель) в 7,3% случаев беременность далее также прогрессирует как одноплодная [18].

Поскольку, согласно формуле частоты рождения близнецов (*Hellin's rule*), в среднем в популяции без использования вспомогательных репродуктивных технологий роды двойней происходят с частотой примерно 1:80, а частота появления многоплодной беременности оказывается в полтора раза больше, вопрос «исчезающего близнеца» вносит значительный вклад в точность неинвазивной диагностики. Так, если исчезающим близнецом окажется резус-положительный эмбрион, а вторым будет резус-отрицательный, ген *RHD* может флотировать в крови матери, хотя в итоге беременности произойдет рождение резус-отрицательного ребенка. В ряде случаев от неразвивающегося близнеца формируется и сохраняется в течение всего гравидарного периода доля плаценты, клетки которой увеличивают пул *ffDNA* в плазме материнской крови [19].

В последние годы на рынке отечественных лабораторных медицинских изделий появились наборы для проведения ПЦР-анализа резус-фактора плода по материнской крови в реальном времени. Эти методы несколько уступают классическому НИПТ по чувствительности, но тем не ме-

нее многие клиничко-диагностические лаборатории имеют в своем составе группу ПЦР-исследований и, значит, могут применить данную технологию для первичного скрининга резус-антигена-*D* плода по периферической крови женщины.

Возможно, медицинским лабораториям, занимающимся тестами в зоне иммуногематологии беременных, необходимо совместно с врачами-клиницистами выработать некие внутренние алгоритмы неинвазивного определения и уточнения фетальной резус-принадлежности с использованием для скрининга ПЦР-анализ и далее, по показаниям, НИПТ материнской крови.

В своей работе и лаборатория, и клиницисты должны учитывать нынешние возможности лабораторной диагностики и классические методы, отраженные в нормативных документах.

В настоящее время в соответствии с Приложением № 5 к Приказу Минздрава РФ от 01.11.2012 № 572н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)» [19] всем беременным женщинам при постановке на учет в ЛПУ определяются группа крови и резус-фактор. У пациенток с отрицательным резус-фактором проводится обследование отца ребенка на групповую и резус-принадлежность. В случае диагностированной резус-отрицательной принадлежности крови отца беременность в дальнейшем ведется как неосложненная и профилактика резус-изоиммунизации при данной беременности не показана.

На сегодняшний день во всем мире при отсутствии резус-антител в крови матери и при резус-положительной или неизвестной по какой-либо причине принадлежности крови отца принята тактика ведения периода гестации как беременности резус-положительным плодом. В подобной ситуации стандартно проводят мероприятия по предотвращению иммунизации. С этой целью беременной ежемесячно необходимо проведение скринингового обследования на наличие и уровень титра анти-*D*-антител вплоть до 28 недели

гестации. В случае отсутствия у матери на этом сроке гестации резус-изоиммунизации ей показано введение препарата анти-*D*-иммуноглобулина внутримышечно, что позволяет уменьшить риск иммунизации на 80%. Данные антитела связывают клетки плода в материнском кровотоке, предотвращая, таким образом, образование собственных антител. Этим объясняется возможность профилактического введения матери антирезус-глобулина для блокирования иммунного ответа. Даже при инъекции иммуноглобулина антирезус *Rho(D)* с запаздыванием до 2 недель от момента попадания в кровоток матери резус-положительных фетальных клеток, его протективный эффект обнаруживается в 50% случаев.

Иммуноглобулин человека антирезус *Rho(D)* также вводится несенсибилизированным резус-отрицательным женщинам в ситуации, если произошли потенциально сенсибилизирующие события:

- угроза прерывания беременности с кровянистыми выделениями из половых путей независимо от срока;
- любые инвазивные процедуры (биопсия ворсин хориона, амниоцентез, кордоцентез);
- коррекция истмико-цервикальной недостаточности (серкляж);
- поворот плода на головку при тазовом предлежании;
- удаление пузырного заноса;
- внутриутробная гибель плода при данной беременности;
- травма брюшной полости с риском образования ретрохориальной гематомы;
- редукция числа эмбрионов при многоплодии;
- прерывание беременности;
- операция по поводу внематочной беременности.

Дополнительная профилактика резус-изоиммунизации на ранних сроках гестации не исключает планового введения антирезус-иммуноглобулина в 28 недель.

После антенатального профилактического введения антирезус-иммуноглобулина в течение 12 недель возможно выявление следовых уровней титра резус-антител, что делает нецелесо-



ВитроКлиник

центр передовых
репродуктивных технологий

МОСКВА • ТУЛА • ЛИПЕЦК



БАЗАНОВ Павел Александрович

руководитель сети
центров репродукции «ВитроКлиник»,
врач-гинеколог-репродуктолог,
член РАРЧ, ESHRE, ASRM

Лицензия № 10-77-01-016886-000 «ВИТРОКЛИНИК»,
г. Москва, Волоколамский
проезд, дом 1а

НАПРАВЛЕНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ:

- ЭКО (ИКСИ, ПГД), в т.ч. применение ЭКО с минимальной стимуляцией и ЭКО в естественном цикле
- ЭКО по транспортной схеме для пациентов из других городов
- Донорские программы и суррогатное материнство
- Центр мужской репродукции (андрология, анализы эякулята, TESA, TESE)
- Генетические исследования

ПРЕИМУЩЕСТВА СОТРУДНИЧЕСТВА:

- Вы контролируете состояние Ваших пациентов в своей клинике на протяжении лечения
- Оперативная связь с врачом-репродуктологом нашей клиники при подготовке к ЭКО, схемам стимуляции и пр.
- Индивидуальный подбор схем стимуляции яичников, способов оплодотворения (ЭКО, ИКСИ, ПИКСИ)
- Высокое качество ВРТ в соответствии со всеми российскими и международными стандартами

ВАРИАНТЫ СОТРУДНИЧЕСТВА С «ВИТРОКЛИНИК»:

Прохождение полного цикла ЭКО в «ВитроКлиник», включая обследование. Далее пациент возвращается к Вам для дальнейшего наблюдения по беременности

Обследование пациентов проводится в Вашей клинике, все этапы ЭКО — в «ВитроКлиник». Пациент возвращается к Вам для дальнейшего наблюдения по беременности

Транспортная схема ЭКО. Обследование и стимуляция суперовуляции осуществляется Вами, пункция фолликулов, эмбриологический этап и перенос эмбрионов проводится в «ВитроКлиник». Далее пациент возвращается к Вам для дальнейшего наблюдения по беременности

Реклама

Центр передовых репродуктивных технологий «ВитроКлиник»

Тел.: **8 (495) 781-01-10**
Сайт: витроклиник.рф

Москва, Волоколамский проезд,
д. 1а (м. «Тушинская»)

образным ввиду ложноположительных результатов дальнейшее проведение скрининговых исследований.

Препарат повторно вводится пациенткам не позднее чем через 72 часа после родов резус-положительным ребенком.

В случае сенсибилизации женщины попадает в группу риска развития ГБ плода, и на протяжении всего гестационного периода проходит динамическое наблюдение, включающее определение титра антител по схеме, утвержденной приказами МЗ РФ, УЗ-диагностику, начиная с 20-й недели беременности, ежемесячно, с 32-й — каждые 14 дней и, при необходимости, симптоматическую терапию. Родоразрешение проводится в 36–38 недель беременности.

Сложившийся в настоящее время в Российской Федерации алгоритм мониторинга и профилактики резус-конфликта матери и ребенка рекомендует всем резус-отрицательным женщинам (при резус-положительном отце ребенка) обязательное введение анти-*D*-иммуноглобулина в сроке 28 недель беременности [19]. Однако среди людей

европейской популяции резус-отрицательная беременная в 40–45% случаев вынашивает резус-отрицательный плод, и в этой ситуации потребность в динамическом лабораторном обследовании и иммунопрофилактике ГБ отсутствует [3, 5, 20]. Иммунопрофилактика, как профилактическая мера, связанная с введением белкового препарата (иммуноглобулина анти-*Rho(D)*), является бесполезным, небезопасным и дорогостоящим мероприятием [2, 17]. Цена иммуноглобулина высока, он производится из плазмы или сыворотки крови иммунизированных доноров, что может быть связано с минимальным риском передачи инфекций. К тому же отечественный иммуноглобулин человека антирезус *Rho(D)*, представленный в настоящее время фармацевтическом рынке России, не стандартизирован. Да и сама процедура введения препарата может сопровождаться нежелательными побочными эффектами: развитием реакции гиперчувствительности, повышением температуры тела, диспепсическими расстройствами, аллергическими проявлениями вплоть до развития анафилактического шока, артралгиями и др.

Молекулярно-генетические методы диагностики фетального резус-фактора, как высокоинформативные скрининговые тесты, позволяют добиться целенаправленной, обоснованной профилактики резус-конфликта, которая будет выполняться только в случаях беременности резус-отрицательной женщины резус-положительным плодом. Ценность установления фетального резус-фактора очевидна. Всем резус-отрицательным женщинам после 10 недель гестации может быть выполнен анализ по определению резус-фактора плода, и только при получении положительного результата возможно принятие решения о проведении анти-*D*-иммуноглобулиновой терапии.

Сегодня можно говорить о необходимости включения в стратегию мониторинга и профилактики резус-конфликта матери и ребенка раннюю молекулярно-генетическую неинвазивную скрининговую диагностику резус-фактора плода по крови беременной женщины как способ с хорошими аналитическими характеристиками, отличающийся медико-экономической

эффективностью и высокими показателями чувствительности и специфичности. Эти методы имеют значительный потенциал для широкого внедрения и использования в акушерской практике. Данные методы молекулярно-генетического лабораторного неинвазивного определения резус-фактора плода описаны в клинических рекомендациях 2017 года [22].

Таким образом, молекулярно-генетические методы неинвазивной диагностики фетального резус-генотипа по крови беременной женщины являются эффективными инновационными скрининговыми методами с высокой чувствительностью и специфичностью, позволяющими установить резус-принадлежность и персонализированно подойти к ведению каждой резус-отрицательной беременной пациентки, избегая лишних финансовых затрат. При этом женщина не подвергается рискам, связанным с необоснованным введением антирезус-иммуноглобулина и осуществлением инвазивных процедур, у нее не увеличивается вероятность резус-сенсibilизации

в сравнении с амнио- или кордоцентезом, а также благодаря уверенности в здоровье своего будущего ребенка снижается уровень тревожности и создается атмосфера психологического спокойствия.

Заключение

Пренатальные методы неинвазивного установления резус-фактора плода у резус-отрицательных беременных женщин на основе изучения *ffDNA*, полученной из материнской плазмы, с последующей ПЦР-амплификацией в режиме реального времени являются точными и надежными для клинического применения благодаря высокой чувствительности и специфичности уже на 10-й неделе гестации. Используя полученные результаты, а также клинические и иные лабораторные данные о пациентке в динамике, акушер-гинеколог принимает мотивированное решение о необходимости профилактического введения иммуноглобулина анти-*Rho(D)*.

Пренатальный скрининг обладает значительным потенциалом для широ-

кого внедрения во врачебную практику с целью ранней неинвазивной диагностики фетального резус-фактора по периферической венозной крови беременной женщины. Включение в программу обследования резус-отрицательных беременных молекулярно-генетических методов неинвазивной пренатальной диагностики резус-фактора плода по крови матери не только улучшает качество оказания медицинской помощи резус-отрицательным беременным женщинам, но и снижает расходы на динамическое обследование и иммунопрофилактику в период гестации.

Список литературы

1. Акушерство: национальное руководство / под ред. Г. М. Савельевой, Г. Т. Сухих, В. Н. Серова, В. Е. Радзинского. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. — 1024 с. — (Серия «Национальные руководства»).
2. Федорова Н. И., Тетраушвили Н. К., Файзуллин А. З., Карнаухов В. Н., Амбрумянц Д. В., Сидельникова В. М., Сухих Г. Т. Неинвазивная диагностика резус-принадлежности плода по крови матери на ранних сроках беременности. // Вестник РУДН: Серия Медицина. — 2009. — № 6. С. 137–141.
3. Трубникова Л. И., Тороповский А. Н., Жмырко Е. В., Никитин А. Г., Бурганова Р. Ф., Лысова О. В. Опыт внедрения в клиническую практику методики неинвазивного пренатального



лаборатория
ДИАЛАБ

**МЕДИЦИНСКИЕ
АНАЛИЗЫ ДЛЯ ВСЕЙ
СЕМЬИ**

ШИРОКИЙ СПЕКТР ТЕСТОВ

Общеклинические исследования	Биохимические исследования	Цитологические исследования	Гормоны и онкомаркеры	Исследования гемостаза
Исследования мазков	Индивидуальные аллергены	Цитогенетические исследования	Оценка иммунного статуса	Диагностика инфекций
Молекулярно-генетические исследования	Химико-токсикологические исследования	Анализы полимеразной цепной реакции	Гистологические исследования операционного и биопсийного материала	

 dialab.ru
  vk.com/dialab_lab
  @dialab.ru
  ok.ru/dialab
  facebook.com/dialab.ru

8 800 302 50 80

- исследования пола и резус-фактора плода на раннем сроке по крови беременной женщины. // Ульяновский медико-биологический журнал. — 2015. — № 2. — С. 71–79.
4. Ткаченко Л. В., Костенко Т. И., Свиридова Н. И., Гриценко И. А., Складановская Т. В., Углова Н. Д. Профилактика резус-изоиммунизации беременных женщин. // Лекарственный вестник. — 2018. — Том 12, № 3 (71). — С. 27–30.
 5. Legler TJ, Müller SP, Haverkamp A, Grill S, Hahn S. Prenatal RhD Testing: A Review of Studies Published from 2006 to 2008 // *Transfus Med. Hemother.* — 2009. — Vol. 36, N3. — P. 189–198.
 6. Основные показатели здоровья матери и ребенка, деятельность службы охраны детства и родовспоможения в Российской Федерации. / М.: Департамент мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения Министерства здравоохранения Российской Федерации, ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2018. — 169 с.
 7. Lo YMD., Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Christopher WGR, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum // *Lancet.* — 1997, August 16. — Vol 350. — P. 485–487.
 8. Баранов В. С., Кузнецова Т. В., Кашеева Т. К., Ивашенко Т. Э. Пренатальная диагностика наследственных болезней. Состояние и перспективы. — 2-е изд., перераб. и доп. — СПб: Эко-Вектор, 2017. — 471 с. ил.
 9. Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma // *Prenat Diagn.* — 2013; Vol. 33, N7 — P. 662–666.
 10. Farina A, Caramelli E, Concu M, Sekizawa A, Ruggeri R, Bovicelli L, Rizzo N, Carinci P. Testing normality of fetal DNA concentration in maternal plasma at 10–12 completed weeks gestation: a preliminary approach to a new marker for genetic screening // *Prenat. Diagn.* — 2002. — Vol. 22. — P. 148–152.
 11. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum / Honda H. [et al.] // *Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 110. — P. 75–79.
 12. Pertl B, Sekizawa A, Samurao O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats // *Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 106. — P. 45–49.
 13. Zolotukhina TV, Shilova NV, Voskoboeva EY. Analysis of cell-free fetal DNA in plasma and serum of pregnant women // *J. Histochem. Cytochem.* — 2005 — Vol. 53, N3 — P. 297–299.
 14. Chiu RWK, Lo YMD. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma // *N. Eng. J. Med.* — 1998. — Vol. 339. — P. 1734–1738.
 15. Rouillac-Le Sciellour C, Sérazin V, Brossard Y, Oudin O, Le Van Kim C, Colin Y, Guidicelli Y, Menu M, Cartron J-P. Noninvasive fetal RhD genotyping from maternal plasma. Use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhD // *Transfus. Clin. Biol.* — 2007. — Vol. 14, N6. — P. 572–577.
 16. Lo YMD. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2001. — P. 945.
 17. Малышева О. В., Боранов В. С. Неинвазивная пренатальная диагностика. Проблемы, подходы и перспективы. // Журнал акушерства и женских болезней. — 2012. — Том LXI, выпуск 3. — С. 83–93.
 18. Landy HJ, Keith LG. The vanishing twin: a review // *Hum. Reprod. Update.* — 1998. — Vol. 4, N2. — P. 177–183.
 19. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01.11.2012 № 572н (в ред. Приказов Минздрава РФ от 17.01.2014 № 25н, от 11.06.2015 № 333н, от 12.01.2016 № 5н) «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)».
 20. Тюмина О. В., Тихонова О. М., Ключников Д. Ю., Мельников В. А. Оценка медико-экономической эффективности пренатального неинвазивного скрининга резус-фактора плода. // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2017. — Том 16, № 6. — С. 30–35.
 21. Маркелова А. Н., Мельников В. А., Тюмина О. В. Значение пренатальной диагностики резус-фактора плода для улучшения качества оказания медицинской помощи беременным с резус-отрицательной кровью в современных экологических условиях. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. — 2012. — Том 14, № 5 (2). С. 388–390.
 22. Резус-сенсibilизация. Гемолитическая болезнь плода. Клинические рекомендации (Протокол лечения) / Г. М. Савельева [и др.] // М.: 2017. — 16 с.

Для цитирования. Хабаров С. В., Денисова О. В., Девиченский В. М. Роль молекулярно-генетической неинвазивной лабораторной диагностики в профилактике резус-конфликтной беременности // Медицинский алфавит. Серия «Современная лаборатория». — 2019 — Т. 3. — 22(397). — С. 78–83



**ИСМП
2019**

**Конгресс
с международным участием**

«Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. ИСМП-2019»

**28-29 ноября
2019**

Место проведения:

Здание Мэрии Москвы, ул. Новый Арбат, 36

Документация по данному учебному мероприятию представлена в Комиссию по оценке учебных мероприятий и материалов для НМО. Регистрация на сайте обязательна **www.expodata.info**

Оргкомитет конгресса:

ООО «Экспо пресс»

129515, Москва, ул. Ак. Королева, 13, оф. 806;

Тел.: (495) 617-36-43/44; Факс: (495) 617-36-79;

E-mail: lvov.m.g@inbox.ru; www.expodata.info

Технический организатор:



Организационный партнёр:



КОАГУЛОМЕТРЫ ЭМКО



АПГ2-02 Двухканальный полуавтоматический анализатор показателей гемостаза.

АПГ2-02П Двухканальный полуавтоматический анализатор показателей гемостаза. Встроенный принтер.

АПГ4-02П Четырехканальный полуавтоматический анализатор показателей гемостаза. Встроенный принтер.

АПГ2-03П Двухканальный полуавтоматический анализатор показателей гемостаза. Сенсорный экран, встроенный контроль качества (по приказу МЗ РФ №220), принтер.

АПГ2-03ПХ Двухканальный полуавтоматический анализатор показателей гемостаза. Сенсорный экран, встроенный контроль качества (по приказу МЗ РФ №220), принтер, возможность выполнения хромогенных тестов.

АПГ4-03П Четырехканальный полуавтоматический анализатор показателей гемостаза. Сенсорный экран, встроенный контроль качества (по приказу МЗ РФ №220), принтер.

АПГ4-03ПХ Четырехканальный полуавтоматический анализатор показателей гемостаза. Сенсорный экран, встроенный контроль качества (по приказу МЗ РФ №220), принтер, возможность выполнения хромогенных тестов.

**МЛТ-РЕАГЕНТЫ ДЛЯ РУТИННЫХ ТЕСТОВ ПЛАЗМЕННОГО ГЕМОСТАЗА:
МЛТ-ТРОМБОПЛАСТИН, МЛТ-АЧТВ, МЛТ-ФИБРИНОГЕН, МЛТ-ТРОМБИН**



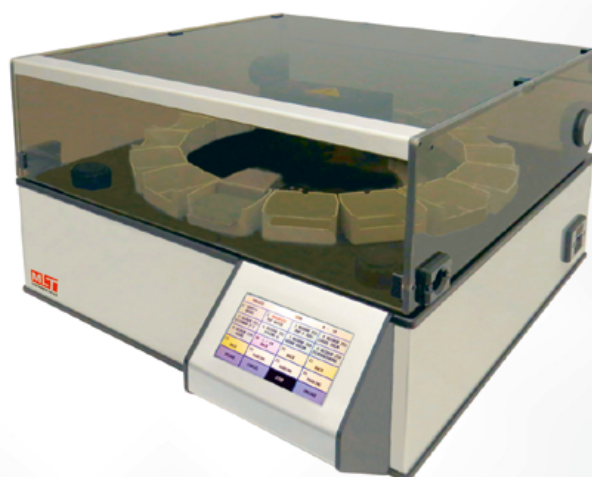
129301, г. Москва, ул. Касаткина, д. 11, стр.1;
тел. / факс: +7 (495) 287-81-00, 287-84-00;
www.emco.ru, www.stainer.ru, emco@bk.ru



АВТОМАТЫ ОКРАСКИ

ГЕМАТОЛОГИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ, ПАРАЗИТОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ГИСТОЛОГИЯ

- Открытая система (любые реагенты и методики)
- Высококачественная однотипная окраска
- Высокая производительность
- Реализация сложных методик (ПАП-тест, гистология)
- Безопасные условия труда
- Низкая себестоимость окраски
- Шесть приборов, 6-8-13-16 станций:
АФОМК-6, АФОМК8-Г-01, АФОМК8-В-01,
АФОМК-13-ПАП, АФОМК-16, АФОМК-16-25



**НАБОР РЕАГЕНТОВ МЛТ-ПАП-ДИФФ
ДЛЯ ОКРАСКИ ПО ПАПАНИКОЛАУ**

NYCOCARD READER II

Ваш первый экспресс-анализатор



**Nycocard Reader II –
мультифункциональный анализатор
для экспресс-диагностики.**

**С помощью Nycocard Reader II
медицинские работники
в различных учреждениях
здравоохранения могут проводить
точные количественные тесты
за считанные минуты.**

ПРИЗНАННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ NYCOCARD

Прибор Nycocard READER II отличается надежностью и высоким, стабильным качеством. Заводская калибровка прибора обеспечивает точные результаты. Портативный прибор разработан для быстрого и надежного измерения тестов Nycocard. Ручная калибровка для различных партий реагентов не требуется. При запуске проводится простая калибровка белого и черного, после чего прибор готов к работе.

ИНФОРМАЦИЯ О ПРИБОРЕ

Номер по каталогу	1116086
Тип дисплея	ЖК, 2х16 символов
Интерфейс передачи данных	RS-232
Вес (включая считывающее перо и батареи)	540 г
Габариты	
Корпус прибора	200 x 170 x 70 мм
Считывающее перо	
Длина:	144 мм
диаметр:	29,5 мм
Условия эксплуатации	
Температура	15–35 °C
	(рекомендуемый диапазон 18–25 °C)
Относительная влажность	0–90%
Избегайте прямых солнечных лучей и излишнего затемнения	

ОЧЕВИДНЫЕ ПРЕИМУЩЕСТВА

- Одна платформа, 4 теста: HbA1c, U-альбумин, СРБ и D-димер
- Удобный в применении
- Быстрые, количественные результаты
- Отлично подходит для небольших серий измерений
- Выбор языка интерфейса
- Легкое обслуживание
- Портативный, питание от батарей (опционально)
- Простая процедура анализа
- Корректировка/калибровка черного
- Калибровка белого
- Измерение тестов Nycocard

ДОСТУПНЫЕ ТЕСТЫ И КОНТРОЛИ

ТЕСТЫ

Nycocard HbA1c, Nycocard U-Albumin,
Nycocard CRP, Nycocard D-Dimer

КОНТРОЛИ

Nycocard HbA1c, Nycocard U-Albumin,
Afinion CRP



ЗАО БиоХимМак

119991 Москва, Ленинские Горы,
МГУ имени М.В. Ломоносова, д.1, стр. 11
телефон: (495) 647-27-40; факс: (495) 939-09-97
e-mail: express@biochemmack.ru

www.biochemmack.ru

БЛАНК-ЗАКАЗ на подписку на журнал 2019 год



Медицинский алфавит

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» — 2 выпуска в год (800 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Больница» — 2 выпуска в год (800 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Неотложная медицина» — 2 выпуска в год (800 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Диагностика и онкотерапия» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Современная поликлиника» — 2 выпуска в год (800 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» — 2 выпуска в год (800 руб. в год)
- ☐ «Медицинский алфавит». Серия «Дерматология» — 2 выпуска в год (800 руб. в год)
- ☐ Спецвыпуски: «Ревматология в общей врачебной практике», «Эндокринология»

Наш индекс в каталоге
«РОСПЕЧАТЬ» 36228

Извещение	ООО «Альфмед»
	(наименование получателя платежа) 7716213348
	(ИНН получателя платежа) Р/с № 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 2019 год
	(наименование платежа) Дата _____ Сумма платежа _____
	Платательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____
Квитанция	ООО «Альфмед»
	(наименование получателя платежа) 7716213348
	(ИНН получателя платежа) Р/с № 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 2019 год
	(наименование платежа) Дата _____ Сумма платежа _____
	Платательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____

Как подписаться

1. Заполнить прилагаемый бланк-заказ и квитанцию об оплате. 2. Оплатить квитанцию в любом отделении Сбербанка у кассира с получением кассового чека. Журналы высылаются по указанному в квитанции или бланке адресу. 3. Отправить бланк-заказ и скан квитанции с кассовым чеком, выданным кассиром банка на e-mail: medalfavit_pr@bk.ru, или podpiska.ma@mail.ru. Оплата через банки-онлайн издательством временно не принимается и будет возвращена на Ваш счет.

Медицина будущего

Концепция 4П

Персонализированная

«Несмотря на все новшества в лекарственной терапии, ключевым фактором является **индивидуальный** генетический фон пациента»

Бахарех Раббани и соавт., Иран¹

Партисипативная

«... Организация антикоагулянтных кабинетов является экономически эффективной альтернативой лабораторного контроля МНО» ...
« Данный проект персонализации позволил существенно **повысить приверженность** пациентов к данному виду терапии, **снизить и профилировать осложнения, инвалидизацию** пациентов, обеспечить мониторинг достижения целевых индикаторов Государственной программы «Развитие здравоохранения» в части сердечно-сосудистых заболеваний.»

Воробьева Н.А. и соавт., Российская Федерация³

Прогностическая

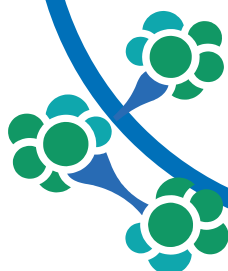
«Определение NT-proBNP является не только хорошим **диагностическим инструментом**, но и адекватным **прогностическим** маркером для госпитализированных пациентов с сердечной недостаточностью»

Я-Тинг Хуанг и соавт., Тайвань²

Профилактическая

«Можно до умопомрачения заниматься лечением, но главное (и, думаю, со мной согласятся онкологи) – профилактика»

Зуев А.Ю., Российская Федерация⁴



1. Rabbani et. al, Mol Biosyst. 2016 May 24;12(6):1818-30.
2. Ya-Ting Huang et. al, Sci Rep. 2016 Jul 14;6:29590.
3. Воробьева Н.А. и соавт., Лабораторная служба. 2018;7(2): 56-62.
4. Интервью Зуева А.Ю. «Патологоанатомы шагнули в космос», Городская газета «Йошкар-Ола», 14.11.2013.





АЛТЭЙ

ЛАБОРАТОРНАЯ ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА

ТЕХНОЛОГИЯ УСПЕХА



117519, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 132
Тел.: (495) 314-29-24, 314-71-30, факс 315-63-84
E-mail: marketing@altey.ru
www.altey.ru