



№ 18 октябрь 2007

КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор:

Эмануэль В. Л., д. м. н., проф.

Заместители главного редактора:

Зыбина Н. Н., д. б. н.

Сухоруков В. С., д. м. н., проф.

Директор редакции:

Чердниченко Д. В.

Зав. редакцией:

Эмануэль Ю. В., к. м. н.

Редактор перевода:

Филиппова Н. А.

Адрес редакции:

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

Телефон редакции:

(812) 233 97 26

Эл. почта:

evl@spmu.rssi.ru

consilium.journal@gmail.com

ejvcons@mail.ru

Журнал зарегистрирован

в Северо-Западном
окружном межрегиональном
территориальном управлении
Министерства РФ по делам
печати, телерадиовещания
и средств массовых коммуникаций

Свидетельство о регистрации:

ПИ № 2-6476 от 21.03.2003

Учредитель:

**Отделение Ассоциации
Медицинской Лабораторной
Диагностики,
СПб Государственный
Медицинский Университет
им. акад. И. П. Павлова
(197022, Санкт-Петербург,
ул. Льва Толстого, д. 6/8)**

Оригинал-макет и верстка:

ООО «Издательско-
полиграфическая
компания «КОСТА»»,
тел. **(812) 445 10 02**

Отпечатано в типографии

ООО «ИПК БИОНТ»
199026, Санкт-Петербург,
Средний пр., д. 86
Тираж 1500 экз.
Заказ №

Объектом деятельности службы практического здравоохранения принято считать общественное и индивидуальное здоровье, а целью — укрепление и охрану здоровья. Эти положения закреплены и определены термином «здравоохранение». Общеизвестен и термин «здоровье» — как состояние полного физического, психического и социального благополучия, а не только как отсутствие болезней или физических дефектов. При этом известно, что сегодня здравоохранение как совокупная медицинская деятельность влияет на состояние индивидуального и общественного здоровья примерно на 15–20%. На оставшиеся 80% составляющих здоровья современная практическая медицинская деятельность влияния не оказывает и, следовательно, не соответствует здравоохранительным задачам. Фактически нарушается целостность здравоохранительной отрасли, и разграничивается смысловая нагрузка терминов «здоровье» и «здравоохранение», суживается предмет и поле практической деятельности службы здравоохранения.

Есть основания рассчитывать на то, что лабораторная медицина в XXI веке сумеет внести изменения в систему здравоохранения, в истинном ее смысле — охрана здоровья. Это обосновано тем, что в структуре причин заболеваемости и смертности около 70% приходится на болезни неинфекционного характера, имеющие мультифакторный генез, обусловленные, однако, генетически детерминированными «биологическими дефектами», и именно лабораторные признаки являются «сырьем» для их выявления на стадии предболезни.

К началу XXI века лабораторные методы с определенной убежденностью не только сформировали представление о характере многочисленных физиологических и биохимических процессов в организме, но и во многом определили степень индивидуальной изменчивости тех или иных составляющих «биохимического скелета», что обуславливает эффективность так называемых «саногенетических», т. е. обеспечивающих здоровье организма, систем. Научные достижения и внедрение постгеномных технологий позволяют вплотную подойти к описанию «Паспорта здоровья». Диспансеризация здоровья населения стала национальной идеей России при реализации Национального проекта «Здоровье».

На страницах нашего журнала будут представляться материалы, раскрывающие современные возможности лабораторной диагностики в указанном направлении.

Редколлегия

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Афанасьев Борис Владимирович,
зав. кафедрой гематологии, трансфузиологии и трансплантации СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, д. м. н., профессор

Гуревич Виктор Савельевич,
руководитель Центра атеросклероза и нарушений липидного обмена СПбГМА им. И. И. Мечникова, д. м. н., профессор

Дюк Вячеслав Анатольевич,
ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского института информатики и автоматизации РАН, д. т. н.

Зыбина Наталия Николаевна,
начальник НИО клинико-биохимических исследований Всероссийского Центра экстренной и радиационной медицины МЧС, д. б. н. (заместитель главного редактора)

Карпищенко Анатолий Иванович,
начальник кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, д. м. н., профессор

Петришев Николай Николаевич,
зав. кафедрой патофизиологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, з. д. н. РФ, академик МАНВШ, академик РАЕН, д. м. н., профессор

Сухоруков Владимир Сергеевич,
руководитель НИЛ общей патологии НИИ педиатрии и детской хирургии РАМН, главный специалист по лабораторной диагностике в педиатрии, д. м. н., профессор (заместитель главного редактора)

Тещ Виктор Вениаминович,
зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, академик РАЕН, д. м. н., профессор

Шляхто Евгений Владимирович,
директор ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова», заведующий кафедрой факультетской терапии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, главный кардиолог Санкт-Петербурга и Северо-Западного федерального округа, вице-президент Всероссийского научного общества кардиологов, президент Российской антигипертензивной лиги, председатель Санкт-Петербургского научного общества кардиологов им. Г. Ф. Ланга, член-корр. РАМН, з. д. н. РФ, д. м. н., профессор

Эмануэль Владимир Леонидович,
заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, д. м. н., профессор (главный редактор)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Вавилова Татьяна Владимировна,
профессор кафедры факультетской терапии СПбГМА им. И. И. Мечникова, д. м. н.

Каллер Андерш,
профессор кафедры клинической химии Каролинского Госпиталя, Стокгольм, Швеция, член бюро Международного Союза чистой и прикладной химии, д. м. н., профессор

Козлов Антон Владимирович,
зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики СПбМАПО, д. м. н., профессор

Корячкин Виктор Анатольевич,
зав. кафедрой анестезиологии, реаниматологии и интенсивной терапии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, д. м. н., профессор

Мазуров Вадим Иванович,
зав. кафедрой терапии № 1 им. Э. Э. Эйхвальда СПбМАПО, член-корр. РАМН, з. д. н. РФ, д. м. н., профессор

Меньшиков Вадим Владимирович,
руководитель научно-методического центра по лабораторной диагностике МЗ РФ, член-корр. РАЕН, з. д. н. РФ, д. м. н., профессор

Новик Виктор Иванович,
зав. лабораторией цитологии НИИ онкологии им. проф. М. Н. Петрова МЗ РФ, член Международной Академии цитологии, д. м. н.

Рыбакова Маргарита Григорьевна,
зав. кафедрой патологической анатомии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, д. м. н., профессор

Сапрыгин Дмитрий Борисович,
президент Российской Ассоциации медицинской лабораторной диагностики, д. м. н., профессор

Сельков Сергей Алексеевич,
руководитель лаборатории иммунологии НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, член-корр. РАЕН, д. м. н., профессор

Смирнов Алексей Владимирович,
зав. кафедрой пропедевтики внутренних болезней СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, директор НИИ нефрологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, вице-президент Всероссийского общества нефрологов, Председатель Ассоциации нефрологов и врачей гемодиализа Северо-Запада России, д. м. н., профессор

Соколовский Евгений Владиславович,
заведующий кафедрой дерматовенерологии клиники СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, д. м. н., профессор

Стивен Хау Ян Вонг (Steven How Yan Wong),
Ph. D., DABCC (TC), FACB, председатель секции Протеомики и Молекулярной Патологии Американской Ассоциации Клинической Химии, США

Тогузов Руслан Тимофеевич,
зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ФУВ РГМУ, д. м. н., профессор

Хоровская Лина Анатольевна,
доцент кафедры клинической лабораторной диагностики СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, к. м. н.

ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО	1
Редакционная коллегия, редакционный совет	2
<i>В.В. Вельков</i>	
МНОГОМЕРНАЯ БИОЛОГИЯ XXI ВЕКА И КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА	4
ЛАБОРАТОРНЫЙ МОНИТОРИНГ ФАРМАКОТЕРАПИИ: ДИАГНОСТИКА В НЕВРОЛОГИИ	
<i>David Berry, Medical Toxicology Unit, Guys and St. Thomas' Foundation Trust, London, UK</i>	
THERAPEUTIC DRUG MANAGEMENT (TDM) OF THE ANTICONSULSANT DRUGS IN THE TREATMENT OF EPILEPSY	15
<i>Девид Берри</i>	
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ АНТИКОНВУЛЬСИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЛЕЧЕНИИ ЭПИЛЕПСИИ	20
<i>К. В. Щёколов, И. М. Барбас, А. М. Попович, А. А. Скоромец, М. Н. Смирнов</i>	
ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРА РОНКОЛЕЙКИНА У БОЛЬНЫХ РАССЕЯНЫМ СКЛЕРОЗОМ В СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ. КОНСИЛИУМ У ПОСТЕЛИ БОЛЬНОГО	27
ЛАБОРАТОРНЫЙ МОНИТОРИНГ ФАРМАКОТЕРАПИИ: КОРРЕКЦИЯ ГЕМОСТАЗА	
<i>Н. Н. Петрищев, Л. В. Васина, Т. Д. Власов, Н. А. Гавришева, М. А. Меншутина</i>	
ТИПОВЫЕ ФОРМЫ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ	31
<i>Ю. Е. Москаленко, И. Н. Дементьева, М. И. Кадинская, С. В. Буров</i>	
ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ RGD-ПЕПТИДОВ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО СВЕТОДИОДНОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА АДФ-ИНДУЦИРОВАННУЮ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ	36
<i>А. В. Варданян, Р. Б. Мумладзе, Д. Ю. Белоусов, Е. В. Ройтман</i>	
КЛИНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОФИЛАКТИКИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ВЕНОЗНЫХ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ	41
ЛАБОРАТОРНАЯ И ИНСТРУМЕНТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА: СРАВНЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ И ОГРАНИЧЕНИЙ	
<i>Л. Б. Дрыгина, Н. А. Бигельдина</i>	
ТЕСТ «ГАСТРОПАТЕЛЬ» ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДКА	55
<i>В. Ю. Кравцов, Ю. А. Грухин, И. А. Михайлова, С. Н. Прошин, А. С. Кондрашин, М. Г. Кобиашвили, Н. Г. Кухина</i>	
ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ <i>HELICOBACTER PYLORI</i> ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИХЕЛИКОБАКТЕРНОЙ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ ПУТЕМ ДОПОЛНЕНИЯ СТАНДАРТНОГО ЭРАДИКАЦИОННОГО КУРСА САНАЦИЕЙ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ	66
<i>Д. Ю. Семенов, Р. В. Чеминава, Е. Н. Смолина, И. А. Степнов</i>	
ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЛАПАРОСКОПИЯ В СОВРЕМЕННОЙ ЭКСТРЕННОЙ АБДОМИНАЛЬНОЙ ХИРУРГИИ И ЛЕЧЕНИИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ	71
ООО «КОРВЕЙ»	75
<i>А. Н. Асанов</i>	
ООО «БИНАЛИТИКА»	
НОВЫЙ ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР С ПРОТОЧНОЙ КЮВЕТОЙ «БИЛАБ-100»	77
<i>Н. В. Юргель</i>	
ПИСЬМО ОТ 29 МАРТА 2007 Г. № 01И-231/07 «О ГОСУДАРСТВЕННОМ МЕТРОЛОГИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ И НАДЗОРЕ ЗА ИЗДЕЛИЯМИ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ»	79
<i>А. Н. Шибанов</i>	
О ГОСУДАРСТВЕННОМ МЕТРОЛОГИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ И НАДЗОРЕ ЗА ИЗДЕЛИЯМИ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ	80

МНОГОМЕРНАЯ БИОЛОГИЯ XXI ВЕКА И КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

В. В. ВЕЛЬКОВ

ЗАО «ДИАКОН», г. Пушкино, Московская область

Резюме. В статье обсуждаются современные взгляды на патогенез и раннюю диагностику различных патологических состояний, включая заболевания сердечно-сосудистой системы и почек, аллергические состояния, злокачественные опухоли. У пациентов с этими заболеваниями определяются специфические для данного заболевания изменения генома, транскрипции ДНК и синтеза белков, что дает возможность успешного применения методов, оценивающих состояние генома, для ранней лабораторной диагностики указанных состояний.

Ключевые слова: геном, транскрипция РНК, синтез белка, клиническая лабораторная диагностика.

HIGH DIMENSIONAL BIOLOGY OF XXI CENTURY AND CLINICAL LABORATORY DIAGNOSIS

V. V. VELKOV

Company «DIAKON», Moscow Region, Pushchino

Summary. The article discusses the modern view of pathogenesis and early diagnosis of different pathological conditions including cardiovascular and kidneys diseases, allergy, malignant neoplasms. In all these diseases the specific changes at the genome level can be revealed, as well as the changes of RNA transcription and protein synthesis. This makes the genome-based methods of laboratory diagnosis important for early diagnosis of the diseases.

Key words: genome, RNA transcription, protein synthesis, clinical laboratory diagnosis.

«Есть время разбрасывать камни.
И есть время собирать камни».
Экклезиаст

Одна из главных задач XXI века — остановить пандемическое распространение болезней цивилизации: сердечно-сосудистых, ишемической болезни сердца, диабета, метаболического синдрома, онкологических заболеваний. Что должна сделать лабораторная диагностика для решения этой задачи? Она должна: во-первых, уметь своевременно определять генетическую предрасположенность к возникновению наиболее серьезных патологий. Как становится все более очевидно, многие такие патологии могут вызваться мутациями. Во-вторых, с высокой достоверностью определять количественный показатель риска возникновения патологий, когда они еще находятся в бессимптомном состоянии, это позволит проводить меры, предупреждающие развитие заболеваний. И, в-третьих, за счет измерения динамики концентрации новых биомаркеров проводить оперативный мониторинг реакции организма на терапию и на хирургическое вмешательство. Эти задачи уже успешно решаются. И происходит это благодаря революционным достижениям биологии XXI века — ее назвали многомерной биологией (high dimensional biology). В нее входят:

Геномика — идентификация **всех** генов человека и структурных нарушений в них, приводящих либо к наследственным заболеваниям, либо к предрасположенности к ним.

Транскриптомика — идентификация **всех** матричных РНК, кодирующих белки, определение количества каждой индивидуальной мРНК, определение закономерностей экспрессии **всех** генов, кодирующих белки, у данного индивида в данных условиях.

РНОмика — идентификация **всех** некодирующих РНК, определение количества каждой индивидуальной нкРНК — определение закономерностей экспрессии **всех** нкРНК у данного индивида в данных условиях.

Метабомика — идентификация и количественное определение **всех** метаболитов, синтезируемых (или находящихся) в данных клетках, тканях, органах, биологических жидкостях у данного индивида в данных условиях.

Биоинформатика. Использование вычислительной техники, математики и информационной теории для анализа и моделирования молекулярно-биологических систем, в особенности систем, состоящих из генов, РНК, белков и метаболитов и др. Создание баз данных.

Все эти подходы, для краткости называемые OMICS (genomics, transcriptomics и т. д.), активно применяются практически во всех отраслях биологии, от изучения нанобактерий — до генной инженерии сельскохозяйственных животных и растений. Но, как полагают некоторые эксперты, главная цель развития всех OMICS — их применение в здравоохранении.

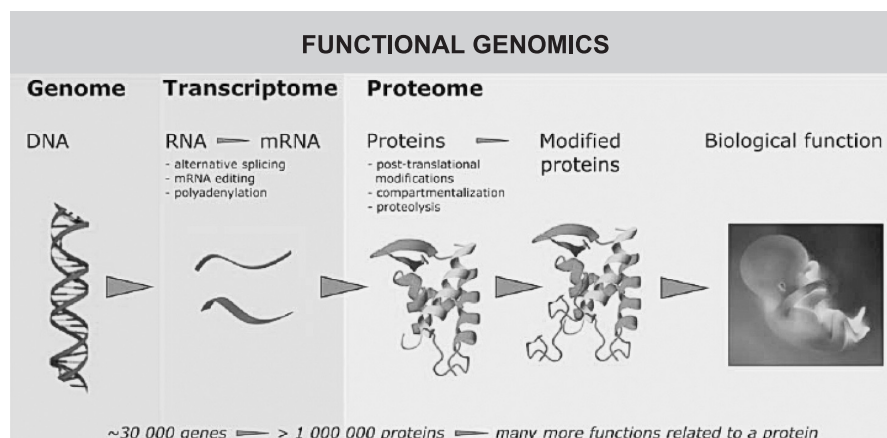


Рис. 1

Клиническая геномика

Широкое применение геномной инженерии, в частности методов секвенирования ДНК (определения последовательности нуклеотидов), и выполнение проекта «Геном человека» позволяют обнаруживать мутации в генах, приводящие к наследственным заболеваниям или к повышению вероятности возникновения многих патологий, таких, например, как онкологические, сердечно-сосудистые (атеросклероз), диабет, метаболический синдром, шизофрения и др. В практику лабораторной диагностики уже успешно внедрены методы идентификации мутаций, наиболее часто приводящих, например, к различным раковым заболеваниям. Эти методы основаны на применении ПЦР (полимеразной цепной реакции) и маркерных генов, содержащих мутации, приводящие к конкретным патологиям. Развитие геномики патологий позволяет, однако, не только проводить их молекулярно-генетическую диагностику, но и, как следующий этап реализации ее достижений, определять интенсивность синтеза белков, имеющих отношение к возникновению и развитию заболеваний. Это делается с помощью определения транскрипционных профилей, характеризующих экспрессию всех генов, активных в данном образце (рис. 1). Технологии, при этом применяемые, основаны на так называемых «ДНК микрочипах» (рис. 3) (DNA microarray). Такой генный чип — это твердая подложка (микроплощадка, особый пластик), на которую в определенном порядке нанесены в виде точек индивидуальные гены (их ДНК). Чтобы определить, транскрибируется ли данный участок ДНК, и как, если «да», на чип помещают (с определенными координатами) лишь часть гена — олигонуклеотид. Этот олигонуклеотид соответствует экспрессируемой части гена (экзону). Затем из образца (например, опухоль) выделяется вся (суммарная) РНК. На основе всех молекул РНК данного образца получают их ДНК-копии (обратная транскрипция), которые флуоресцентно метят и потом проводят гибридизацию с иммобилизованными на микрочипе олигонуклеотидами. Если в данных условиях какие-то точки с конкретными генами не экспрес-

сируются («молчат» — черный цвет), это значит, что данный ген не транскрибируется. Если же данная точка матрицы «светится», значит, олигонуклеотиды в этой площадке прогибридизовались с флуоресцентно меченой ДНК, ген транскрибируется.

В реальном эксперименте все точки на биочипе в той или иной мере «светятся». Чтобы определить, является ли полученный результат ошибкой эксперимента или нет, проводится сравнение двух объектов (рис. 2). Для этого берут образец А (патология), из него получают суммарную РНК и флуоресцентно метят (красным) все ее молекулы. То же проводят и с образцом В (норма), но метят РНК другим цветом (зеленым). Затем проводят гибридизацию микрочипа со смесью этих двух препаратов РНК (конкурентная гибридизация — преимущество образуют гибриды тех молекул, которых больше). Если сигнал в данной точке на чипе будет красным, значит в клетках А (патология) транскрипция данного гена

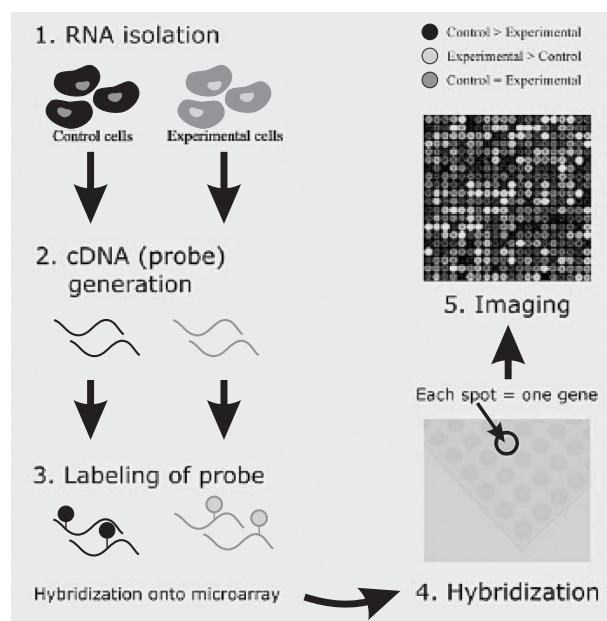


Рис. 2

сильнее, чем в клетках В (норма). Если сигнал зеленый, то транскрипция сильнее в клетках В (норма). Если красного и зеленого поровну, то получится желтый цвет. Таким образом, можно сравнивать уровень транскрипции данного гена в разных тканях и органах, в биологических жидкостях при норме и патологии, до терапии и в ее процессе, до хирургической операции и после нее. Довольно часто термины «геномика», «транскриптомика» и «протеомика» употребляются в одном и том же значении — для обозначения анализа экспрессии всех генов данного образца — как на уровне синтеза мРНК, так и на уровне синтеза белков [1–3].

Клиническая транскриптомика.

Транскрипционные профили патологий

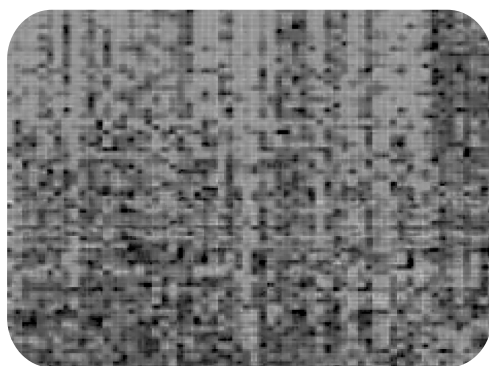
Транскриптом — набор всех РНК, находящихся в данном образце. Анализ транскриптома, или определение качественного и количественного профиля всех синтезированных РНК, отражает синтез кодируемых ими белков, а также синтез так называемых некодирующих РНК (рибосомальных, транспортных и др., см. раздел РНомика). Сравнение транскриптомов, нормальных и патологических образцов, позволяет идентифицировать новые маркеры, проследивать изменение их концентрации во времени и судить о динамике патологии, об эффективности проводимого лечения и прогнозировать его результат [4–6].

Предполагается, что каждая болезнь, характеризуется своим штрих-кодом — уникальным паттерном

дируют белков и не являются ни рибосомальными, ни транспортными. Это так называемые некодирующие РНК. И играют они, в основном, регуляторную роль — влияют на экспрессию генов (чаще всего на уровне трансляции). Эти так называемые микроРНК (длиной 19–22 нуклеотида) (к ним относятся интерференционные РНК), которые выключают синтез определенных белков на уровне трансляции их мРНК. МикроРНК регулируют экспрессию генов после их транскрипции. Это может происходить за счет трех основных механизмов:

- 1) репрессии трансляции мРНК,
- 2) расщепления мРНК,
- 3) ускорения распада мРНК.

В каждой микроРНК есть участок, комплементарный особому участку в той мРНК, которая при каких-то обстоятельствах подлежит инаktivации. Таким образом, большинство мРНК имеют особые участки («черные метки»), указывающие на возможность собственной дегградации, а микроРНК, имеющие комплементарные участки, в нужный момент узнают «черные метки» и нацеливают на мРНК, приговоренные к ликвидации, ферменты и белки, для этого предназначенные. С помощью РНомики микроРНК, содержащиеся в образцах, идентифицируются, определяется их концентрация. Как еще более неожиданно оказалось, изменения концентрации различных микроРНК свидетельствуют о большом числе различных патологий. И в клинической РНомике наступила «золотая лихорадка» по поиску «золотых» маркеров и предикторов [7–12].



Микрочипы могут быть использованы для исследования экспрессии, связанной с возникновением или прогрессией заболевания (например, опухолевого или инфекционного), поскольку каждая болезнь, вероятно, характеризуется специфичными изменениями наборов экспрессируемых генов по сравнению с нормальным состоянием.

Рис. 3

уровней транскрипции набора генов, характерного именно для данной болезни. Разумеется, анализировать транскриптомы надо не методом «прищуренного глаза», а с помощью компьютерных методов распознавания образов. В данном случае, патологических.

Клиническая РНомика

Пожалуй, самой громкой сенсацией биологии конца XX века стало открытие принципиально нового класса РНК. Практически во всех на этот счет исследованных эукариотных организмах неожиданно было обнаружено огромное количество различных РНК, которые *не ко-*

Клиническая протеомика

Это идентификация и количественное определение *всех* индивидуальных белков, которые содержатся в образце (сыворотка крови, спинномозговая жидкость, моча, биопсийный материал), и мониторинг изменения их концентраций в течение заболевания. Протеом — совокупность *всех* белков, содержащихся в данном образце. Полный анализ протеома клеток, тканей и органов и биологических жидкостей проводится с помощью двумерного электрофореза с высоким разрешением и с последующей идентификаций индивидуальных белков с помощью масс-спектрометрии. Это позволяет проана-

лизировать до 10 000 индивидуальных белков в одном образце и зафиксировать изменения этих концентраций. Вот типичная последовательность операций при протеомике: 1) отбор образца (клетки, ткань, биологическая жидкость), 2) приготовление образца, лизис клеток, экстракция белков, 3) изоэлектрофокусировка, электрофорез в 1-м направлении, 4) электрофорез во 2-м направлении, полиакриламидный гель, додецилсульфат натрия, 5) проявление белковых пятен на геле, 6) анализ двумерной электрофореграммы белковых пятен, количество пятен, их расположение, 7) выделение участков геля, содержащих индивидуальные белковые пятна, 8) расщепление трипсином прямо в геле препаратов индивидуальных белков, 9) масс-спектрометрический анализ: а) масс-фингерпринтинг пептидов, б) определение аминокислотных последовательностей фрагментов индивидуальных белков, 10) идентификация каждого белка и измерение его концентрации, документирование, обработка результатов (биоинформатика, базы данных). Значительному прогрессу в области протеомики способствовали успехи масс-спектрометрического анализа пептидов. Масс-спектрометрия включает в себя четыре основных компонента. Во-первых, в ионном источнике масс-спектрометра из образца получают ионизированные пептиды или белки. Во-вторых, разделение ионов пептидов и белков происходит в анализаторе масс на основе их величины отношения массы к заряду (m/z). В-третьих, детектор ионов (время пролетного масс-спектрометра) регистрирует отдельные ионы, с указанием значения m/z иона, количества ионов и времени пролета ионов от источника ионов до детектора ионов. И, наконец, интерпретация полученных данных с помощью биоинформатики, анализ баз данных, в итоге, получение дифференциального профиля белков.

Уже открыты новые белковые маркеры и получены весьма впечатляющие результаты в области **кардиоваскулярной** протеомики и **онкопротеомики** [13–18].

Кардиоваскулярная геномика, транскриптомика и протеомика

Повышать вероятность возникновения и развития атеросклероза могут мутации во многих генах. Такие мутации идентифицированы, например, в гене ALOX5AP (кодирует белок активатор липооксигеназы 5); в гене FLAP (кодирует белок активатор липооксигеназы), этот белок активирует синтез лейкотриена — липида, медиатора воспалительного процесса в стенках сосудов; в гене MEF2A (кодирует фактор регуляции транскрипции в миоцитах); в гене ApoE (кодирует аполипопротеин E, входящий в состав Х-ЛПВП); в гене LTA (кодирует ген альфа-лимфотоксина) (17–18). Уже созданы базы данных по сотням белков протеома миокарда, уровни которых изменяются при хронических и острых сердечно-сосудистых патологиях. Обнаружено, что при таких патологиях возрастают концентрации так называемых белков теплового шока (heat-shock proteins — HSP),

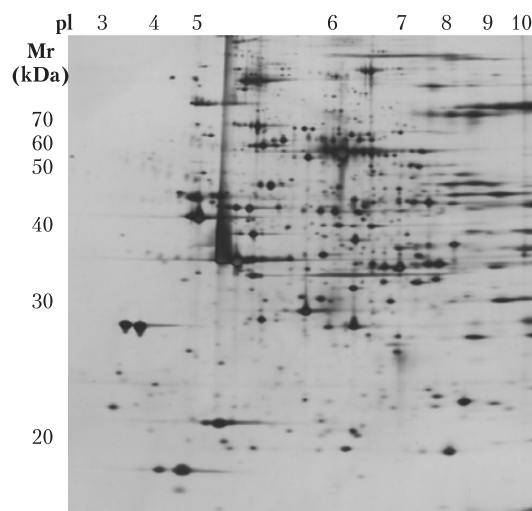


Рис. 4. Двумерный гель-электрофорез образца биопсии левого желудочка (left ventricular) пациента, страдающего дилатационной кардиомиопатией, перенес трансплантацию сердца. Изоэлектрическое фокусирование в диапазоне pI — 3–10, диапазон молекулярных масс белков от 15 до 100 кДа. На геле приблизительно 600 белков, которые затем были идентифицированы масс-спектральным анализом

белков митохондрий, а также белков, вовлеченных в генерирование энергии. Диагностически важные белки кардиопротеома классифицируются так: 1) белки, связанные с энергией и метаболизмом, 2) белки, индуцируемые стрессом, 3) белки, обеспечивающие контрактильные функции и формирование цитоскелета [19–20].

Весьма перспективным оказался мониторинг динамики протеомов биопсии, взятых до и после хирургического вмешательства (рис. 4). Обнаружено более 100 кардиоспецифических белков, уровни которых значительно изменяются при дилатационной кардиомиопатии. Практически при всех формах сердечной недостаточности ее начальная стадия — это компенсаторная адаптация сердечной ткани к патологическим изменениям — в частности, гипертрофия левого желудочка. Довольно часто в таких случаях клинические, электрокардиографические и гемодинамические показатели не достаточно адекватно отражают переход от патологии к норме. Показано, что возвращение к норме при вентрикулярном ремоделировании может быть эффективно достигнуто при мониторинге кардиопротеома (21). Согласно предварительным данным, наиболее обещающими маркерами для кардиопротеомики могут быть тропонины, изоформы альфа-1-фибриногена, изоформы аполипопротеина А-1, С-реактивный белок и др. Полагается, что кардиопротеомная техника станет незаменимой при сердечно-сосудистой хирургии. В передовых клиниках хирурги уже сейчас читают кардиопротеомы так же уверенно, как кардиограммы и ангиограммы [22].

Транскриптомика и протеомика плазмы крови

Сколько **всего** индивидуальных белков в плазме крови? Какие новооткрытые белки плазмы могут иметь

диагностическое значение? Когда и как изменяются их уровни, и о чем это говорит? Проект «Протеом Плазмы Крови» (ППК) был начат в 2002 году. По дерзости и масштабности ППК можно сравнить с проектом «Геном человека». В реализации ППК участвуют 35 лабораторий в 13 странах. На первой стадии проекта была создана аннотированная база данных о **3020** белках плазмы крови человека (www.bioinformatics.med.umich.edu/hupo/ppp; www.ebi.ac.uk/pride). Она содержит информацию о: 1) идентификации каждого белка, 2) его концентрации и стабильности, 3) об особенностях его масс-спектрального анализа и др. [23, 24]. На второй стадии проекта было идентифицировано уже **9504** белка (на основе масс-спектрометрической идентификации одного или двух пептидов каждого белка) и **3020** белков (при идентификации двух и более пептидов, что более точно). **889** белков плазмы идентифицированы с достоверностью в 95%. Следующий этап — построение протеомов плазмы, характерных для различных патологий, и формулировка международно согласованных их диагностических показателей [25, 26].

Протеомика гемостаза

Протеомика тромбоцитов — быстро развивающееся направление. Уже обнаружены ранее неизвестные белки тромбоцитов, быстро идет расшифровка механизмов, приводящих к нарушениям коагуляции. В ранних исследованиях протеомов тромбоцитов было обнаружено, что при активации они секретируют 82 белка. Затем при использовании тромбоцитов, стимулированных тромбином, было установлено, что **секретом** (секретируемый протеом) тромбоцитов — это более 300 белков, и только 37% из них были известны ранее. 35% белков, секретируемых тромбоцитами, секретируются также и другими клетками. 28% белков секретома тромбоцитов ранее обнаруживались в местах атеросклеротических повреждений. Эти работы привели к идентификации новых мишеней для новых лекарственных препаратов — это секретогранин III, циклофилин А и калуменин, и пролили свет на возможные механизмы адгезии тромбоцитов, способствующие развитию атеросклероза [27].

Транскриптомика и протеомика кровообращения

Циркулирующие в кровотоке моноциты способствуют развитию воспаления в стенках артерий, что приводит к атеросклерозу. Анализ транскриптома моноцитов неожиданно обнаружил, что у пациентов, которые перенесли коронарную реваскуляризацию, повышен уровень экспрессии белка онкогена FOS (может вызывать остеосаркому Финкеля—Бискиса—Джинкиса). Что принципиально, корреляция между повышенным уровнем экспрессией гена FOS и реваскуляризацией была выше, чем корреляция между реваскуляризацией и уровнем «золотого» маркера атеросклероза — С-реактивного белка [28].

Онкогеномика, онкотранскриптомика, онкопротеомика

Уже обнаружены маркерные гены, активирующиеся на ранних стадиях онкогенеза, и соответствующие им маркерные белки, найдены маркеры, позволяющие проводить молекулярную классификацию опухолей, обнаружены предикторы метастазирования, предикторы ответа на терапию, маркеры, позволяющие прогнозировать развитие различных онкозаболеваний. Основные задачи онкопротеомики таковы: 1) построение протеомов и их динамики при возникновении и развитии различных опухолей и различных опухолевых клеток, 2) идентификация путей передачи клеточных сигналов, приводящих к онкогенезу (см. раздел «ОнкоРНОмика»), 3) идентификация маркеров для диагностики онкозаболеваний и мониторинга ответа опухоли и организма на хирургическое вмешательство и на разные типы терапии, 4) определение иммунного ответа на онкогенез [29–35]. Весьма интересны данные по изучению геномики и протеомики белка p53 — супрессора опухолей, и белков, с ним взаимодействующих. Мутации в гене белка p53 весьма часто приводят к канцерогенезу. Но при острых амилоидных онкозаболеваниях у 90% пациентов обнаруживается нормальный, а не мутантный ген p53. Однако в случае наличия мутаций в этом гене — данная патология часто становится устойчивой к химиотерапии. Более того, протеомика белка p53 позволила выявить все белки, с которыми он взаимодействует, и установить цепи передачи внутриклеточных сигналов, приводящих к злокачественному росту и к устойчивости к химиотерапии [36]. Основная проблема во внедрении онкопротеомики в практику — как быстро научить онкологов читать карты онкотранскриптомов и онкопротеомов и понимать сложный комплекс молекулярных и статистических данных.

ОнкоРНОмика

Одно из самых сенсационных открытий в молекулярной биологии, сделанных в конце XX века, как уже говорилось, — открытие принципиально нового класса РНК. Эти РНК ничего не кодируют. В подавляющем большинстве случаев они очень маленького размера — от 19 до 22 нуклеотидов, поэтому их раньше никто не замечал и поэтому их называют также микроРНК. Их функция — регуляторная. Они, за счет комплементарности части своих нуклеотидов с соответствующими нуклеотидами мРНК, блокируют их трансляцию. И тем самым выключают синтез конкретных белков на посттранскрипционном уровне — после того как РНК уже синтезирована. На данный момент у человека идентифицировано около 400 генов, кодирующих разные микроРНК, и, скорее всего, их список будет расти. Интерес к ним крайне высокий. Как показали и продолжают показывать совершенно неожиданные результаты последних лет — изменения в синтезе микроРНК сильно

связаны с возникновением, прогрессированием и метастазированием злокачественных опухолей. Некоторые микроРНК при этом сверхсинтезируются. Синтез других падает. Некоторые исследователи даже полагают, что именно нарушение регуляции синтеза микроРНК, которые, в свою очередь, как отмечалось, являются регуляторами синтеза белков — если не первопричина онкогенеза, то, по крайней мере, одна из главных причин [37–41].

Более 50% генов, кодирующих известные микроРНК человека, расположены в областях хромосом, связанных с онкогенезом. Некоторые микроРНК могут функционировать как онкогены — индуцируют онкогенез. К этому приводит повышение их синтеза. Другие микроРНК проявляют себя как супрессоры опухолей — подавляют неконтролируемую пролиферацию. Например, сверхсинтез микроРНК miR-17-92. Эта микроРНК проявляет себя как онкоген, подавляет активность гена, который, в свою очередь, должен обеспечивать синтез белка — супрессора опухолей или белка, который должен стимулировать апоптоз («запрограммированную смерть») раковых клеток. А сниженный синтез некоторых микроРНК, например, микроРНК let-7, проявляется как действие опухолевого супрессора, который может ингибировать онкогенез за счет инактивации белков, вызывающих деление клеток [42]. Название микроРНК, связанных с онкогенезом, — *oncomiRs* (**oncogenic micro RNA**) [43].

С помощью онкоРНОмики идентифицирован, в частности, комплекс микроРНК, который позволяет однозначно дифференцировать рак поджелудочной железы от доброкачественных опухолей этого органа. В этот комплекс входят около 100 различных микроРНК. Их содержание в опухолях поджелудочной железы в 30–50 раз превышает нормальные уровни. Полагается, что открытие этих микроРНК не только повысит возможности ранней диагностики рака поджелудочной железы, но и, возможно, ляжет в основу создания препаратов, ингибирующих их активность и, тем самым, подавляющих развитие опухолей поджелудочной железы [44]. В другом исследовании различные специфические профили синтеза около 100 разных микроРНК были обнаружены в нормальной поджелудочной железе, при панкреатите и раке поджелудочной железы. Эти профили позволяют проводить четкую дифференциальную диагностику указанных патологий [45]. В опухолях рака груди идентифицированы 4 типа микроРНК с особо резко измененными концентрациями, что, в свою очередь, оказалось связанным повышенной пролиферацией и инвазивностью клеток опухоли [46].

Повышенные уровни микроРНК miR-103 и miR-107, сопровождающиеся исчезновением микроРНК miR-155, позволяют проводить дифференциальную диагностику опухолей эндокринных желез и ацинозных опухолей. Повышенный синтез микроРНК miR-204 связан с инсулиномами и коррелирует с повышенным уровнем

инсулина, регистрируемым иммуногистохимическими методами. А сверхсинтез микроРНК miR-21 сильно связан с образованием метастазов в печени [47].

Давно известно, что хромосомы злокачественных клеток характеризуются высоким спектром структурных аномалий, которые располагаются не случайным образом, а в специфических точках и, тем самым, представляют собой маркеры для цитологической диагностики. Как оказалось, в таких «горячих точках» структурных аномалий хромосом весьма часто располагаются гены, кодирующие микроРНК, и экспрессия этих генов, в таких случаях, сильно нарушена, либо повышена для одних микроРНК, либо понижена для других. Работы по идентификации таких РНК и по выяснению их связи с локализацией структурных аномалий хромосом и с различными типами злокачественных опухолей — одни из самых перспективных [48]. Уже идентифицировано, в частности, 7 микроРНК, гены которых расположены кластером в области хромосомы, которая амплифицирована (многократно повторена) в лимфомах и в некоторых солидных опухолях. Такая амплификация, как правило, ведет к повышенной экспрессии генов, в ней расположенных [49].

Вопросы о том, как именно и какие именно стрессогенные факторы вызывают онкогенез, обсуждаются довольно давно. В модельных опытах с использованием культур клеток показано, что при стрессогенных воздействиях (арсенат натрия, дефицит фолата) происходит глобальное повышение синтеза микроРНК, приводящее к нарушению нормальной сбалансированности их синтезов. Не исключено, что подобные процессы могут происходить и *in vivo* [50].

Однако применение микроРНК перспективно не только для диагностики. Полагается, что введение в раковые клетки синтетических или природных РНК, предназначенных для избирательного подавления патологических повышенных уровней онкомикроРНК — весьма перспективный метод молекулярной терапии злокачественных заболеваний. Работы в этом направлении ведутся весьма интенсивно [51]. Ожидается, что в 2010 году мировой рынок терапевтических препаратов, созданных на основе микроРНК, составит 3,5 млрд долл., а в 2015-м — 10,5 млрд долл. [52].

Ренальная транскриптомика и протеомика

Уже достигнуты значительные успехи в обнаружении новых маркеров в тканях (биопсия), в сыворотке и в моче, свидетельствующих о ренальных заболеваниях, о хронической и острой почечной недостаточности и их динамике. Эти маркеры способны обеспечивать дифференциальную диагностику ренальных патологий, мониторинг их терапии и мониторинг эффективности трансплантации почки [53]. В предварительном, но уже весьма впечатляющем списке новых потенциальных маркеров почечных патологий представлены белки цитоскелета, протеиназы, ингибиторы протеиназ, ферменты

метаболизма, белки, связанные с апоптозом, белки процессов окисления—восстановления, белки, связывающие кальций, белки-транспортеры, сигнальные белки, белки, индуцируемые стрессом, и др. [54].

Эндокринная транскриптомика и протеомика

Различные эндокринные клетки синтезируют различные спектры кодирующих и не кодирующих РНК. Весьма интенсивно ведутся работы по транскриптомике и протеомике всех эндокринных органов, как в норме, так и при патологиях. Результаты регулярно поступают в базу данных «Омнибус Экспрессия Генов» (Gene Expression Omnibus — GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) [55]. Цель эндокринной транскриптомики и протеомики — установить цепь молекулярных событий, от индукции синтеза гормона до реализации его действия в норме и при патологиях, обнаружить мутации, влияющие на эти процессы и разработать методы идентификации таких мутаций, применимые в лабораторной практике [56]. Уже проводится идентификация **всех** РНК, изменение синтеза которых свидетельствует о злокачественных заболеваниях эндокринной системы [57–60]. Уже в 2002 г. было идентифицировано около 400 генов, кодирующих рецепторы, связанные с различными G белками и взаимодействующие с гормонами [61]. Весьма перспективен транскриптомный и протеомный мониторинг и прогнозирование результатов гормональной терапии многих онкологических заболеваний. При разработке методов мониторинга гормональной терапии эстроген-зависимого рака груди был установлен комплекс из 138 генов, активность которых изменяется в ответ на действие эстрогена [62].

На эндокринную активность может негативно влиять большое количество синтетических (антропогенных) и природных соединений, встречающихся в окружающей среде. Такие соединения, называемые эндокринными разрушителями (endocrine disrupters), весьма различаются по структуре и по своему действию. Их идентификация и выяснение механизма их действия с помощью **токсигеномики** считается весьма актуальной задачей [63–64].

Перинатальная транскриптомика и протеомика

Ее задачи, путем анализов транскриптомов и протеомов амниотической жидкости и отшелушившихся клеток плода, в ней находящихся, — определять риск спонтанных абортoв и патологий развития плода (наследственных, врожденных и др.) [65–67].

Аллергопротеомика

Это анализ протеомов IgE антител, в особенности мониторинг изменения IgE протеомов при патологиях. Этот подход уже успешно используется в диагностике аллергических патологий и астмы [68–69].

Геномика, транскриптомика и протеомика стресса

Какие гены наиболее подвержены стрессам? Например, психологическим? Что при этом происходит в цепи событий от синтеза РНК до действия кодируемых ими белков? Как и когда кратковременный стресс приводит к острым или хроническим патологиям? Согласно общепринятой точке зрения, стресс — это координированные физиологические процессы, направленные на поддержание динамического равновесия в организме в стрессовых условиях. Стресс включает особые метаболические, физиологические и поведенческие механизмы, восстанавливающие гомеостаз. Уже проведены работы по исследованию транскриптома лейкоцитов периферической крови пациентов, страдающих депрессией [70].

Нейрогеномика, нейротранскриптомика и нейропротеомика

Это транскриптомика и протеомика тканей, сыворотки, спинно-мозговой жидкости в норме и при нейропатологиях [71–72]. Ранее было показано, что различные типы повреждений головного мозга у крыс приводят к различным профилям транскриптомов в периферической крови. Позже эксперименты по определению транскриптомов и протеомов сыворотки показали, что существуют высокочувствительные и высоко специфические их профили, предсказывающие ишемические инсульты. Также в крови обнаружены специфические профили транскриптомов и протеомов, характерные для синдрома Дауна, для нейрофиброматоза, бугорчатого склероза, болезни Хаттингтона, множественного склероза, синдрома Туретта и др. [73]. Анализ транскриптома и протеома спинно-мозговой жидкости выявил, что мутационные повреждения генов, кодирующих предшественник амилоидного белка, а также белков, которые называются пресенилин 1 и пресенилин 2, повышают вероятность развития болезни Альцгеймера (БА). Обнаружено несколько патогенетических путей возникновения БА, включающих нарушения процессинга предшественника амилоидного белка, деградацию бета-амилоида, нарушение процессов фосфорилирования белков, нарушения липидного метаболизма, нарушения протеолиза, нарушения самосборки белков и др. [74]. Весьма показательны результаты изучения протеомов спинно-мозговой жидкости пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, синдромом Дауна, болезнью Пика, шизофренией, болезнью Паркинсона. Уже идентифицировано около 330 белков, уникальных для нейродегенеративных и психиатрических нарушений. Эти белки участвуют в метаболизме, в формировании цитоскелета, передаче внутриклеточных сигналов, детоксикации и др. [75]. Известные белки, вовлеченные в нейродегенеративные заболевания, — это нормальный *tau* белок, бета амилоидный белок 1–42, синаптические белки, белок — предшественник амилоидного белка, аполипопротеин (ApoE). С помощью протеомики уста-

новлено, что при болезни Альцгеймера (в отличие от других нейродегенеративных заболеваний) в спинно-мозговой жидкости наблюдаются низкие уровни амилоидного белка 1–42 и высокие уровни *tau* белка и его фосфорилированной формы [76]. Обнаружено, что протеом спинно-мозговой жидкости, состоящий, по крайней мере, из 250 белков, резко меняется при травматических повреждениях мозга. При таких травмах в 4 раза возрастают концентрации основных белков острой фазы, уровни изоформ гаптоглобина также повышаются в 4 раза. Однако уровень простагландин-D2-синтазы и цистатин-С-синтазы возрастает в 7 раз [77].

НейроРНОмика

Как оказалось, микроРНК играют ключевую роль и в регуляции синтеза белков, необходимых для образования синапсов. Обнаружено и детально охарактеризовано большое количество микроРНК, локализующихся в местах синаптических контактов, реагирующих на внешние стимулы и, в результате, активирующих специфические ферменты (протеинкиназы), которые, в свою очередь, участвуют в обеспечении таких процессов, как высшая нервная деятельность, память, обучение и др. [78–79]. Весьма похоже, что микроРНК вовлечены в процессы, связанные с ментальностью, и нарушения в синтезе таких микроРНК влияют на память и на показатели коэффициента интеллектуальности (IQ) [80–81].

Психиатрическая геномика, транскриптомика и протеомика

Это направление занимается выяснением того, какие именно мутации, какие специфические изменения транскриптомов и протеомов характерны для психических расстройств [82–83]. Определение транскриптомного профиля уже привело к открытию неожиданных связей между изменениями экспрессии определенных генов и психиатрическими проблемами. Обнаружено, в частности, что вызванные мутациями нарушения экспрессии генов GAD67 (кодирует декарбоксилазу глутаминовой кислоты), RGS4 (кодирует регулятор сигнального белка G4), DTNBP1 (кодирует дисбиндин), NRG1 (кодирует нейрорегулин), GABRB2 (кодирует рецептор А гамма-аминомасляной кислоты) специфичны для шизофрении [84].

Неожиданно протеомика плазмы и спинно-мозговой жидкости пациентов, страдающих шизофренией, выявила изменения уровней аполипопротеинов, участвующих в метаболизме холестерина, в частности снижение в плазме уровня аполипопротеина А-I, центрального белкового компонента Х-ЛПВП [85]. В другой работе обнаружено, что при шизофрении наблюдается повышение уровней белков острой фазы, среди которых альфа2-гаптоглобин, бета-гаптоглобин, предшественник фактора В комплемента, и понижение уровней аполипопротеина А-I и транстиретина (белок плазмы и спинно-мозговой жидкости, переносчик тироидного гормона тироксина)

[86]. А протеомика спинно-мозговой жидкости выявила, что при шизофрении уровень аполипопротеина А-IV значительно снижен. Какую функцию этот компонент хиломикрон и Х-ЛПВП, принимающий участие в обратном транспорте холестерина, играет в ЦНС — неизвестно [87]. Попутно отметим, что низкие уровни в плазме Х-ЛПВП связаны с болезнью Паркинсона [88].

Уже обнаружено 165 генов, мутации в которых могут приводить к аутизму [89].

Транскриптомика и протеомика эмоциональных расстройств

Они устанавливают связь между патофизиологическими и биохимическими и генетическими маркерами биполярных эмоциональных расстройств. Такими маркерами являются моноаминовые трансмисмиттеры, некоторые гормоны, G-белки, вовлеченные в передачу внутриклеточных сигналов [90]. Исследования по геномике с применением модельных систем (мыши) и сравнение полученных результатов с данными геномики эмоциональных расстройств человека выявили, что генами, нарушение функционирования которых ведет к таким расстройствам, являются DARPP-32 (дофамин и цАМФ-регулируемый фосфопротеин, 32 кДа), PENC (препроэнкефалин) и TAC1 (тахикинин 1). Эти данные по сравнению геномики мыши и человека показали, что примитивные молекулярные механизмы, вовлеченные в возникновение и поддержание удовольствия или боли (у мышей), в процессе эволюции стали играть определяющую роль в реализации сложных ментальных функций (у человека), таких как разные эмоциональные состояния. Список таких генов, мутации которых вызывают эмоциональные расстройства, постоянно расширяется, эти гены участвуют в обеспечении суточных физиологических ритмов, в образовании синапсов, связаны с функционированием миелина [91–92].

Протеомика спинно-мозговой жидкости пациентов с синдромом хронической усталости и с болезнью войны в Персидском заливе выявила 20 белков, присутствующих у этих групп пациентов и не обнаруживаемых в контрольной группе. Два из них — альфа-1-макроглобулин и белок, сходный с предшественником амилоидного белка [93].

Тревожность, устойчивость или подверженность к стрессам — это генетически наследуемые характеристики, лежащие в основе многих психиатрических заболеваний. Обнаружено, что тревожность и подверженность стрессам обуславливается мутациями следующих генов: 5-HTT (серотониновый транспортер), COMT (катехоло-метилтрансфераза) [94].

Геномика личности

Хотя то, о чем будет говориться в этом разделе, строго говоря, не относится к лабораторной клинической диагностике, для полноты картины сказать об этом все же надо. Определяются ли генами и мутациями в них,

и, следовательно, особенностями синтезов определенных белков и микроРНК эмоциональные, ментальные и интеллектуальные особенности людей? Первые доказательства, что это действительно так, были получены в многочисленных исследованиях когнитивных и психологических характеристик монозиготных (генетически идентичных) и дизиготных (генетически разных) близнецов в тех случаях, когда они были разлучены и росли в разных условиях окружающей среды. На уровне сравнения интеллектуальных и психологических характеристик таких близнецов было статистически достоверно показано, что практически по всем когнитивным, ментальным, психологическим и поведенческим характеристикам монозиготные близнецы похожи друг на друга и на своих биологических, а не приемных родителей вне зависимости от того, росли они вместе или порознь.

Полагается, что генетически детерминированными являются даже такие, казалось бы, далекие от чисто биологических, характеристики, как: уровень интеллекта, самостоятельность и зависимость, активность и пассивность, мнительность и тревожность, экстравертность и интровертность, чувствительность или толерантность к стрессам, альтруизм и эгоизм, агрессивность или сексуальность. В значительной мере генетически детерминируемыми считаются и такие, казалось бы, социально обусловленные особенности человека, как политические предпочтения (консерватизм, либерализм, радикализм), как отношение к смертной казни и музыкальные вкусы (классическая, легкая или электронная музыка), патологическая азартность, алкоголизм, предпочтительный вид отпуска, маниакально-депрессивные психозы, шизофрения, криминальное поведение. Недавно в седьмой хромосоме были открыты гены «социального поведения», некоторые мутации которых приводят «к открытому поведению», к повышенной общительности (экстравертности) и доброжелательности, к повышенным лингвистическим способностям и к высокому уровню общих когнитивных способностей.

В данный момент список генов, непосредственно участвующих в программировании когнитивных характеристик человека, включает более 150 названий. Полагается, что существенное влияние на личностные характеристики оказывают генетически обусловленные особенности функционирования генов, участвующих в кодировании метаболизма таких нейротрансмиттеров, как серотонин, дофамин, глутамин и др. [95]. Весьма показательно открытие генов, особые мутации в которых характеризуют то, что принято называть «национальным характером», или этнопсихологическими особенностями. Первым «молекулярным» прорывом в изучении геномики этнопсихологических особенностей стало обнаружение мутаций, программирующих «воинственность» или «миролюбие». Антропологи считают так называемым архетипом воинственности индейцев Южной Америки, в частности племЯ Яномамо (Yanomamo), члены которого регулярно встают на тропу войны. Это

вызывается тем, что в гене, кодирующем так называемый рецептор нейротрансмиттера дофамина (DRD4), у этих индейцев очень часто встречается особая мутация 7R, которая делает их весьма агрессивными, возбудимыми, импульсивными и несговорчивыми. У бушменов и восточно-азиатских фермеров (архетипы миролюбия) такая мутация встречается крайне редко. Другие типы мутаций в этом гене, как показала психиатрическая геномика, приводят к гиперактивности, к повышенной конфликтности, к постоянному поиску «острых» ощущений [96]. Эмоциональная сдержанность и межличностная чувствительность, характерные для японской популяции, кодируются так называемыми особыми «короткими» мутантными формами гена-транспортера нейротрансмиттера серотонина 5HTTLPR. Полагается, что высокая частота встречаемости этой мутации в японской популяции является результатом отбора, направленного на избегание исключения личности из социума [97].

В ближайшем будущем станет возможным массовое и быстрое секвенирование геномов конкретных лиц. Сейчас стоимость секвенирования генома индивида, занимающая две недели, составляет 32 000 долл. Стратегическая цель — расшифровка генома за 1000 долл. и за несколько дней, как ожидается, будет достигнута в течение этого десятилетия и сделает эту процедуру, рыночный спрос на которую уже весьма велик, высоко рентабельной. Методы геномики личности, как считается, кардинально изменят облик не только медицины, но и общества в целом, сделав возможным прогнозирование не только развития многих заболеваний, но также и интеллектуальных, ментальных и поведенческих особенностей индивидов [98].

Транскриптомика и протеомика сна и бодрствования

Весьма интересны изменения в транскриптоме при сне, при бодрствовании, при лишении сна и при ходьбе. Полагается, что этот подход может быть перспективным для решения проблем, связанных с бессонницей [99].

Клиническая метаболомика

Метаболомика — построение глобального профиля концентрации метаболитов в данном образце. Основное направление работ — выявление метаболических изменений, характерных для инициации патологий и ее динамики, для закономерностей ответа метаболизма на терапию. Основные патологии, находящиеся в фокусе метаболомики, — метаболический синдром, диабет, сердечно-сосудистые заболевания, патологии печени.

Метаболомика основана на применении спектроскопии протонного ядерного магнитного резонанса в сочетании с компьютерным анализом распознавания образов. Распознавание образов (паттернов) мультиплетной структуры спектров ЯМР — это новый инструмент изучения структуры и свойств органических соединений. Для лабораторной диагностики определяющее

значение имеют спектры протонного ядерного магнитного резонанса сыворотки и спинно-мозговой жидкости и мочи (рис. 5) [100–103].

Метабомика уже показала высокую эффективность при обнаружении врожденных и наследственных нарушений метаболизма, нарушений метаболизма, вызванных эндогенными и экзогенными факторами, при диагностике многочисленных заболеваний, при трансплантациях (до и после), при изучении токсичности лекарственных препаратов (**токсикогеномика**), реакций организма на лекарственные препараты (**фармакогеномика**), при определении индивидуальных особенностей реакции организма на различные пищевые продукты (**нутриномика**) [104].

Но как осмысливать данные метабомики? Как и в какой степени соотносить полученное со сложнейшей общей картиной метаболизма человека? В начале 2007 года сообщено о создании базы данных и компьютерной модели, в которых впервые представлены все биохимические реакции, происходящие в организме человека, и связи активностей генов с обменом веществ и последующей выработкой соответствующих белков, ферментов и метаболитов. Разумеется, карты отдельных метаболических циклов существовали и раньше, однако такая титаническая работа проделана впервые. База данных, которая теперь будет постоянно пополняться, сегодня включает 3300 различных химических реакций. Для этого пришлось просмотреть около 1500 книг и огромное число научных статей, причем без помощи компьютера, поскольку глубина анализа составляла 50 лет, а тогда электронных публикаций не было.

Биохимические реакции и их взаимосвязи описаны для каждого типа клеток организма. В компьютерную модель можно вводить различные исходные данные и на выходе получать результаты в виде концентрации тех или иных веществ. Для испытания системы были использованы 288 различных ситуаций, в частности, синтезы тестостерона и эстрогена, а также метаболизм жиров, поступающих в организм с пищей. Модель имеет общий характер, и в данный момент использовать ее

с учетом особенностей индивидов весьма непросто [105].

Кардиоваскулярная метабомика

Метабомика сыворотки весьма точно диагностирует сердечно-сосудистые патологии и определяет их тяжесть. В частности, обнаружена высокая корреляция между определенными показателями метабомика и количеством стенозов в коронарных сосудах, а также корреляция между этими показателями и эффективностью терапии статинами [106].

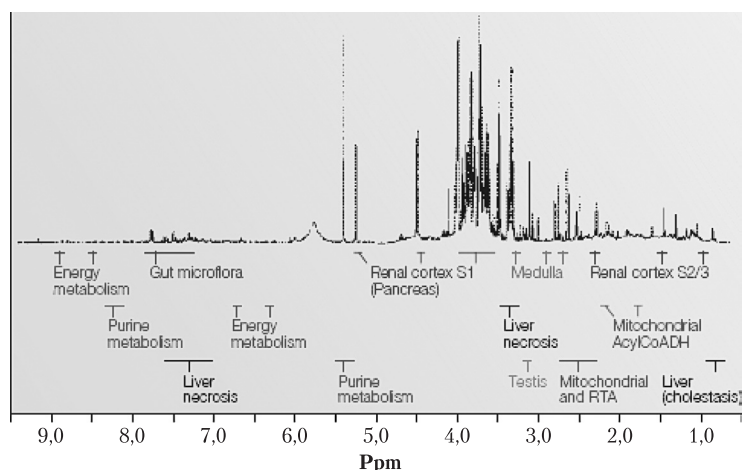
Ренальная метабомика

Изменение профилей метаболитов как в сыворотке, так и в моче довольно точно локализует патологии в почках. Метабомика мониторинг изменений, связанных с применением иммунодепрессантов и других препаратов, обеспечивает надежное прогнозирование процессов, связанных с гемодиализом и трансплантацией. В частности, метабомика уже показала свою эффективность при мониторинге последствий, вызванных трансплантацией почки. Традиционно эти процессы контролируются с помощью мониторинга уровня сывороточного креатинина, выхода мочи, кровяного давления, определения уровня глюкозы и гистопатологии образцов биопсии. В целом, с помощью метабомика в сыворотке крови и в моче были обнаружены новые маркеры, которые позволяют более эффективно проводить мониторинг трансплантации почки, определять степень токсичности иммуносупрессивных препаратов, указывать на локализацию повреждения [107].

Психиатрическая метабомика

Весьма информативными оказались исследования метабомика спинно-мозговой жидкости при шизофрении. Они выявили серьезные нарушения регуляции уровня глюкозы, характерные для этой патологии. Показательно, что у пациентов с шизофренией количество случаев диабета 2 типа составляет 16,8%, тогда как в среднем в популяции встречаемость диабета 2 типа — 2–3% [109].

Рис. 5. Функциональный ЯМР-спектр мочи крыс. Разным цветом обозначены зоны, в которых располагаются спектральные биомаркеры, специфически характерные для различных патофизиологических состояний. Один ЯМР-спектр (одно измерение) дает информацию о большом количестве патологических процессов, обычно о сотнях типов заболеваний [108]



Клиническая липидомика

Это важнейшее направление метаболомики. Нарушения липидного обмена связаны с такими заболеваниями, как атеросклероз, диабет, ожирение, болезнь Альцгеймера. Липидом — липидный профиль грубого липидного экстракта из образца — это масс-спектр, характеризующий липидный состав и концентрации **всех** индивидуальных липидов образца. Подход основан на комбинации жидкостной хроматографии и масс-спектрометрического анализа. Прогресс в липидомике достигнут благодаря разработке новых масс-спектрометрических подходов, в частности, методов «мягкой ионизации», таких как ионизация электрораспылением и матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация. Успехи применения метода масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением содействовали развитию «струйной» липидомики (shotgun lipidomics) и практическому применению разделения компонентов внутри источника ионов в качестве стратегии применения двумерной масс-спектрометрии для изучения состава липидов биологических образцов [110].

Липидомика подразделяется на: 1) липидомiku клеточной архитектуры и мембран (architecture/membrane lipidomics) и 2) липидомiku медиаторов (mediator lipidomics). С помощью липидомики создаются метаболИческие сети, в которых участвуют (практически) все липиды и медиаторы, которые, в свою очередь, являются производными липидов. С помощью этого подхода уже установлено детальное строение мембран многих типов клеток, установлены механизмы активации провоспалительных цитокинов, происходящие за счет медиаторов, связанных с липидами [111, 112].

Клиническая нейролипидомика

Метаболизм липидов играет важнейшую роль в функционировании нервной системы. Нарушения их профиля связаны с серьезными неврологическими патологиями, включающими биполярные расстройства и шизофрению, а также с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Неймана—Пика (Niemann—Pick). Нарушения регуляции липидов связаны также с повреждениями, вызванными ишемическим инсультом. Особенно большое значение имеет нейролипидомика спинно-мозговой жидкости [113].

Многомерная биология: перспективы для медицины и лабораторной диагностики

Научное значение многомерной биологии для медицины переоценить невозможно. Этот подход уже привел к выявлению новых механизмов возникновения и развития многих патологий. В ближайшем будущем следует ожидать появления единой многомерной медицинской науки, раскрывающей детальные молекулярные механизмы отдельных патологий и объединяющей их

в единую систему взаимодействий «гены → РНК → белки → метаболиты → физиологические процессы → психиатрические и психические особенности → ментальные и интеллектуальные характеристики». Похоже, что у врачей появится возможность лечить одновременно больного и его компьютерную модель, построенную на основе его геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики, и по мере лечения корректировать и то, и другое на основе мониторинга динамики его транскриптома, протеома и метаболома. Сейчас, как и раньше, в лечении участвуют трое: врач, болезнь и больной. Но скоро к ним прибавится еще один персонаж: компьютерная модель больного. И такое незначительное количественное увеличение приведет к кардинальным качественным изменениям в системе подготовки врачей.

Что касается ценности «...омика» для лабораторной диагностики — это новые маркеры, которые уже открыты и обязательно будут открыты. Диагностическая ценность маркеров обычно зависит от трех показателей: от чувствительности, специфичности и предсказательной способности (с какой вероятностью и какие концентрации и на какие сроки предиктор предсказывает возникновение и динамику патологии). Как правило, между чувствительностью и специфичностью существует обратная зависимость. К сожалению, маркеры с идеальной специфичностью и чувствительностью очень редки. Но с другой стороны, причина почти всех патологий никогда не одна, а неблагоприятное стечение многих отрицательных факторов. Возможным решением этой проблемы может стать разработка различных стандартных комплексов маркеров, которые все вместе будут давать достоверную предикторскую и/или диагностическую информацию. Поскольку биология высоких измерений позволяет установить причинно-следственные связи в цепи: ген → РНК (кодирующая или микроРНК) → белок → метаболит, такие комплексы маркеров могут состоять из специфических олигонуклеотидов, белков и метаболитов [114].

Следующий этап — разработка для относительно широкого применения узкоспециализированных наборов для транскриптомики, протеомики и метаболомики, например, кардиопатологий, ренальных патологий, различных злокачественных заболеваний, разных биологических жидкостей и т. д. (реагенты, оборудование, инструменты, компьютеры, базы данных, программное обеспечение и др.).

Благодаря этому медицина XXI века станет: 1) предиктивной, 2) превентивной, и 3) персонализированной (предсказывающей, предотвращающей и ориентированной не на лечение болезни, а на четко и научно индивидуализированную терапию конкретного больного).

«И сказали они: построим себе город и башню, высоту до небес...» (Быт. 11:1—9)

(Список литературы имеется в редакции журнала.)

THERAPEUTIC DRUG MANAGEMENT (TDM) OF THE ANTICONVULSANT DRUGS IN THE TREATMENT OF EPILEPSY

DAVID BERRY

Medical Toxicology Unit, Guys and St. Thomas' Foundation Trust, London, UK

Summary. *It is recognised that the desired therapeutic effect of most Anti-epileptic Drugs (AEDs) is achieved within a specific serum concentration range, with lower levels giving an inadequate response and higher levels possibly giving undesirable side-effects. Large differences in drug disposition occur between individuals which cause the dose required to achieve the reference range to be extremely large. Furthermore, many refractory patients require treatment with several AEDs, which can lead to pharmacokinetic drug/drug interactions as can treatment with other pharmaceuticals for co-morbid conditions. Monitoring serum/plasma concentrations of AEDs has proved to be an extremely useful means of assisting in the individualisation of treatment. A large number of AEDs are available, and it is necessary to quantitatively determine each compound that a patient is prescribed. Assay methods include a range of chromatographic procedures, and specific immunoassays, although the latter are not available for all AEDs.*

Key words: *Epilepsy, Drug Monitoring, TDM, Antiepileptic Drugs, Personalised Medication.*

Rational for serum antiepileptic drug determination

The role of drug monitoring in the management of epilepsy reflects epilepsy-related factors as well as the properties of various AEDs. Because treatment is prophylactic and seizures may occur at irregular intervals it can be difficult to find the optimal dose on clinical grounds alone. Furthermore, signs of toxicity may be insidious and difficult to interpret especially among patients with epilepsy who have associated mental handicap. The chronic, sometimes lifelong, treatment also makes it particularly important to monitor therapy to reduce the risk of long-term adverse effects. These arguments for drug monitoring in epilepsy are valid regardless of which AED is involved.

The usefulness of drug monitoring depends on the pharmacological properties of the drug to be monitored, and TDM is most useful for drugs when:

- 1) there is a pronounced interindividual variability in pharmacokinetics,
- 2) the kinetics in the individual patient may be altered by drug interactions, concurrent disease, or other conditions, and
- 3) there is an established correlation between the drug concentration and its therapeutic and toxic effects, particularly if the therapeutic range is narrow.

The pre-requisite for using drug assays in therapy control is the requirement that the relationship between the serum concentration of the active drug and its effects is better than that between dose and effect. Some pharmacological requirements must be fulfilled to obtain a meaningful relationship between the serum concentration of a drug and its effects:

- 1) the drug should have reversible action,
- 2) the development of tolerance should not occur,
- 3) if the drug acts through metabolites these should be measured, and
- 4) the concentration of unbound drug at the site of sampling should ideally be equal to the unbound con-

centration at receptor sites. Hence, while the epilepsy-related rational for drug monitoring is similar for all AEDs the usefulness of monitoring varies among AEDs, depending on their pharmacological and pharmacokinetic properties.

The reference range of serum levels

Most of the older AEDs have a reasonably well-defined reference range of serum levels (Table 1). This range should not be strictly interpreted since many of the underlying studies are based on patients with severe epilepsy treated with multiple AEDs. However, most patients are optimally treated with a drug when its steady-state serum level is maintained within that range and controlled studies in patients prescribed one drug for newly diagnosed or less severe epilepsy are scarce.

Seizure control in mild epilepsy is often attained at levels lower than the usually recommended range while some patients with severe epilepsy require «supratherapeutic» levels to achieve optimal effects. In addition, the required serum level differs according to seizure type, thus, the dose should be titrated to the «optimal serum level» for the individual patient.

The reference ranges for the older AEDs are reasonably well recognized (Table 1), but those for some of the newer AEDs are less well-established and further studies are necessary to determine the precise role that TDM might play in optimizing treatment with these latest drugs. There is good information available for lamotrigine, and for most of the other newer drugs there are indications of a reasonable serum level vs. response relationship. Monitoring serum levels can always be justified when total non-compliance is suspected.

Although further studies are required, tentative reference ranges for the newer AEDs are also given in Table 1. As indicated earlier, seizure control is generally reported at a wide range of serum concentrations, and there

Table 1

Pharmacokinetic variables for the major antiepileptic drugs

Drug	Elimination Half-life (h)	Time to steady-state (days)	Reference range (mg/L)
Older AEDs			
Carbamazepine	8–20	5–10	1.5–9
Clobazam + DCLB	24–48	5–10	<0.2+< 2.0
Clonazepam	20–60	5–10	0.025–0.075
Ethosuximide	40–60	5–10	40–80
Phenobarbitone	50–160	10–35	5–30
Phenytoin	7–60 ^a	4–8	7–20
Primidone	4–12	1–3	<13
Valproic acid	11–20	2–4	50–100
Newer AEDs			
Felbamate	14–22	305	10–100
Gabapentin	5–7	2	2–20
Lamotrigine	8–33	3–15	3–15
Levetiracetam	6–8	2	6–20
Oxcarbazepine ^b	8–15	2–3	10–35
Tiagabine	7–9	2	10–100
Vigabatrin	5–7	1–2	1–35
Topiramate	20–30	4–6	5–20
Zonisamide	50–70	10–15	10–40

^a – concentration dependent

^b – monohydroxyderivative

is significant overlap with concentration seen in nonresponders and with patients reporting side-effects. It seems that with the newer drugs the optimal concentration is individual and this may vary considerably among patients (as is also the case for the older AEDs).

Relationship between dose and serum drug level

Bioavailability of the AEDs varies not only with the mode of administration but also between individuals and drugs. While the drugs are usually administered orally, some can also be given intravenously, intramuscularly, or rectally. After oral administration, maximal serum levels of most AEDs are attained within 2–8 hours of dose intake but the rate and extent of absorption can be influenced by several factors.

Formulations

Absorption rate and bioavailability are affected by the biopharmaceutical formulation and by differences between original and generic preparations. The changeover to a preparation with better bioavailability can give serum levels that are too high, with a subsequent risk of drug intoxication. Conversely, switching to a preparation with poorer bio-

availability can lead to sub-therapeutic serum levels and increased seizure frequency.

Effects of food

The bioavailability and rate of absorption of some AEDs can be greater when they are ingested under fasting conditions, and for others the converse is true.

Protein binding and drug distribution

On entering the circulation many AEDs are partly bound to serum proteins, and an equilibrium is established between free and bound fractions. Only the free drug can cross biologic membranes and interact with specific brain receptors. There is a dynamic equilibrium between drug in plasma and in extracellular cerebral fluid and the drug concentration in plasma is assumed to reflect that in the brain, i.e. the point where they exert their antiepileptic actions. Protein binding differs from drug to drug but normally is quite constant for one AED in the same patient. A reduction in binding can have clinical consequences, particularly with extensively protein-bound drugs such as phenytoin, valproate and tiagabine.

Factors determining the steady-state concentration in serum

The relationship between clinical effect and serum drug levels is evaluated during steady-state conditions. The time taken for steady-state to be achieved after initiation of therapy or changing dose depends on the plasma elimination half-life ($t_{1/2}$) of the drug (Table 1). Theoretically, 97% of the final steady-state serum drug level is achieved after 5 half-lives. For most AEDs the first blood sample should be drawn 1–2 weeks after initiation of treatment or changing dose in order for steady-state to be achieved. The exception is phenobarbitone, for which 3 to 4 weeks is required because of its long half-life. Some AEDs, particularly carbamazepine, increase their own metabolism (autoinduction) causing serum drug levels to decrease somewhat in the initial dosage period. Hence, the time needed before the patient is adjusted to the optimal serum AED levels for clinical efficacy is extended. In general, the dose of all AEDs should be increased gradually with sufficient time to evaluate the clinical effects in order to limit adverse reactions.

A number of factors cause the elimination rate of a drug to vary from one person to another with genetic factors, drug/drug interactions, age and concomitant disease all affecting drug disposition. Fertile women often have faster drug metabolism rates than men, and the rate of metabolism decreases with increasing age for both sexes; furthermore, children generally require higher drug doses (in mg/Kg) than adults to obtain comparable serum levels. Furthermore, renal, hepatic and cardiac disease can alter drug elimination and protein binding to a clinically important extent.

Drug/drug interactions

When a patient is treated with more than one drug, interactions may occur that can alter the therapeutic outcome. These interactions may alter absorption, protein binding, receptor action, metabolism or excretion of the therapeutic agent. The most common interactions affect the rate of drug biotransformation as a consequence of enzyme induction or inhibition. Interactions between and among AEDs and also between AEDs and other drug classes are common. The effect may be to either lower serum AED levels resulting in loss of efficacy or to raise serum levels, which might result in increased adverse effects.

In long-term treatment of epilepsy it is important to be aware of possible drug interactions, and while some interactions are not clinically significant, others can cause a considerable change in the clinical status of the patient. Large interindividual differences in the extent of drug/drug interactions occur, and reliable predictions are difficult to make. When using drug combinations that can generate significant interactions, it is important to watch for loss of efficacy or signs of intoxication. It is also necessary to monitor the drug levels before and 2 to 4 weeks after the addition or withdrawal of a drug and if intoxication occurs and the interacting secondary drug cannot be withdrawn,

the dose of the primary drug should be decreased to return serum levels to the pre-interaction state.

What to measure?

Total vs. non-protein bound serum drug levels

While free levels might be the ideal measure of the therapeutically active fraction, current analytical methods for AEDs in serum are aimed mainly at measuring the total concentration. An important condition for using total serum concentration as a guide for the therapeutic or toxic effect is that protein binding of the particular drug must be constant for the individual patient and the same (or similar) for all patients. Protein binding differs for each drug depending upon its physical and chemical properties as well as on the physical characteristics of the protein. A drug may be either avidly or loosely bound, and displacement from its binding site may result in clinical toxicity because of increased concentration of unbound drug (even though the total level is unchanged). Normally the degree of binding is quite constant, however, a reduction in binding can occur under special conditions, e.g. uraemia (because of endogenous displacers), and this can be important for highly bound drugs such as phenytoin. Patients with hypoalbuminaemia, especially newborns with hyperbilirubinaemia, have a decreased binding capacity that gives a greater free and, thus, therapeutically active drug fraction in serum. The increased free fraction may be either clinically effective or toxic at lower total serum levels than expected. Several methods are available separating free from bound drug and measuring free drug levels.

At present monitoring free drug is not routine, and the application should be restricted to problem cases. It may be particularly useful in patients who fail to respond to AED therapy because of altered protein binding either as a consequence of drug interactions or a special physiological/pathological state, e.g. pregnancy, hepatic or renal failure, etc.

Testing other bio-samples

For most AEDs free drug level can also be obtained from the concentration in CSF, saliva or tears. Access to CSF samples is naturally limited, and studies with tears are rare, however, saliva can be an alternative bio-fluid because the concentration in saliva reflects the free drug level in serum. Precautions must be taken during sample collection to avoid contamination, but under well-controlled conditions saliva can be useful for determination of the non-protein bound drug when a change of binding is suspected. Furthermore, because collection of saliva is non-invasive, it can be a valuable approach when multiple samples are required, particularly from children.

Metabolites

Further refinement of TDM is required when pharmacologically active metabolites of AEDs are also present. The role of some metabolites remains unclear at present,

but with primidone, which is rapidly biotransformed to phenylethylmalonamide (PEMA) and more slowly to phenobarbitone, monitoring the concentration of derived phenobarbitone is most useful and in certain cases the primidone as well. In general monitoring PEMA is not required.

Carbamazepine is also metabolised to produce the pharmacologically equipotent 10,11-epoxide and the inactive 10,11-transdiol. Epoxide levels are generally 5–30% of parent drug levels, and protein binding is 10–20% lower which will increase the pharmacological effects. However, some patients accumulate a higher proportion of epoxide, particularly when co-prescribed valproate, and its measurement can be useful. Oxcarbazepine, the keto derivative of carbamazepine, is rapidly transformed into the pharmacologically active 10-hydroxycarbamazepine, which accumulates in plasma and is responsible for the drugs anticonvulsant action. Monitoring this metabolite is necessary, but serum levels of parent drug are insignificant and not required. Clobazam is also extensively metabolised to pharmacologically active desmethylclobazam (DCLB), which is much more slowly eliminated than parent drug ($t = 40$ hrs vs 20 hrs). Accordingly, DCLB must also be determined because it accumulates to more elevated levels in serum than clobazam and is responsible for the major pharmacological action.

When should serum AED levels be measured?

The importance of TDM in patients receiving long-term AED therapy had been emphasized. The clinical situations for monitoring and deciding when a serum drug level should be measured will vary, depending on the pharmacological properties of the AED, however some general guidelines are:

Initiation of drug therapy, dose adjustment and changes to co-medication

Two to 3 weeks after initiation of drug therapy, once steady-state has been reached, the serum drug level should be measured and correlated with the clinical effect to evaluate whether the dose is optimal. This is particularly relevant for AEDs with a narrow, well-defined target range. However, a drug level for most AEDs at this point will be of value as reference for future management, particularly if therapeutic failure occurs. Dose adjustment is a further indication for monitoring, in particular of AEDs with dose dependent kinetics, and it is mandatory after dosage adjustments of phenytoin and the addition of co-medication that may cause interactions.

Routine measurements

Routine determination of serum AED levels is useful because it gives a basis for comparison if the clinical situation changes. In adults with well-controlled seizures the drug levels should be routinely checked once a year at an annual review. Children should be evaluated more frequently as

they grow, when altered drug disposition can be expected. Frequent monitoring is required at the earliest onset of puberty because metabolic capability changes rapidly at this time, and seizure control can easily worsen because of increasing weight and altered drug disposition. When AEDs are prescribed for neonatal seizures, frequent monitoring is required to assist management of this extremely volatile situation, especially if the child is premature.

Therapeutic failure, toxicity and non-adherence

Drug adherence is often poor in the treatment of patients with epilepsy and may result in inadequate serum levels. Low drug levels will also result when an insufficient dose prescribed, or from a fast metabolic rate (genetic variability or induction). Correspondingly, high serum concentrations may be caused by an excessive prescribed dose or by a slow rate of metabolism (genetic variability or inhibition). When serum drug concentrations are excessive, it may be necessary to withdraw the drug for several days and reinstate at a lower dose when concentrations have returned to an appropriate level.

Other illnesses and co-pathology

Drug monitoring is essential in patients with co-morbid pathology and treatment can influence the disposition of AEDs, e.g. infections and long-lasting diarrhea. In addition, TDM is vital for management of patients with liver and renal dysfunction since pharmacokinetics may be significantly altered. In patients with liver disease the capacity of the hepatic drug-metabolising enzymes may be severely compromised while protein binding is also often reduced. The net effect on the total drug clearance can vary considerably, and monitoring serum levels together with close clinical observation of the patient is important.

In renal disease the clinical picture can vary considerably and the effect on disposition of AEDs may be different between individual patients. With renal impairment the unbound fraction of phenytoin and valproate is invariably increased, but decreasing the dose is rarely necessary because under these circumstances drug clearance increases and a therapeutic effect is often observed at lower total, serum concentrations. The risk of adverse effects caused by drug interactions is in general increased in patients with renal or liver disease.

Pregnancy

Pregnancy is a special case where it is important to maintain good seizure control without side-effects to avoid harm to the mother and foetus either from seizures or the prescribed medication. Women considering pregnancy should be placed on the simplest feasible AED regimen and any major changes in therapy should be made before the patient conceives. Levels should be closely monitored to determine the lowest dose that will achieve effective serum drug levels and keep the risk of drug-induced abnormalities in the child as low as possible.

Pharmacokinetic parameters of most AEDs change significantly during pregnancy resulting in decreased steady-state serum levels, also the proportion of non-protein bound drug may increase. Both total and, if possible for some AEDs, free levels in serum should be measured at regular intervals throughout pregnancy. If drug dosage is increased during pregnancy, it should be returned to pre-pregnancy levels during the first weeks puerperium to avoid toxicity, and drug levels should be checked periodically for at least the first 2 months after delivery.

Drug measurement

Blood sampling

The blood sampling time should be standardised to ensure comparable conditions. Ideally, the samples should be taken pre-morning-dose and if necessary the morning dose can be postponed. This is particularly important for valproate and other drugs with short half-life, because these drugs have great variation in the serum level between dose intake. If drug toxicity is suspected to occur between dose intervals it is best to draw the sample at the time when toxic symptoms are most pronounced, however, the reference ranges are based on trough levels. For a meaningful interpretation of drug levels, information on patient age, weight, sex, diagnosis, indication for analysis, clinical conditions of relevance, all drugs prescribed with total daily dose, sampling time and time of last drug intake are required.

Assay methods

A range of analytical methods is available for the determination of AEDs levels in biological samples, including gas chromatographic, liquid chromatographic and immunoassay procedures. Analytically it is easier to determine the level of a single drug than of a mixture of drugs, however, refractory patients (the most intensively monitored) are often treated with more than one drug and it is most useful to carry out a multi-drug assay in a single sample extract. Chromatographic methods are capable of multi-drug analysis and LC/MS/MS is rapidly becoming the preferred technique.

Immunoassays, which offer a specific measurement of a single drug, are often available in local chemistry laboratories, but currently the range of tests is limited mainly to the older drugs, although the diagnostics industry has recently started developing assays for some of the newer AEDs. The advantages of immunoassay are that they allow relatively unskilled personnel to produce a precise, reproducible result very quickly using only a small sample. Chromatographic procedures require a more specialised laboratory and highly skilled staff and when these are available they can offer assays for all of the drugs. One major advantage of chromatography is its screening capacity, i.e. it will detect drugs, which the physician is not aware are being ingested (a not uncommon finding).

Quality control

It is vital that the provider laboratory actively participates in both an external quality assurance scheme and an internal quality control scheme in order to ensure reliable results. Excellent analytical quality is vital for effective TDM, and inaccurate results may result in patient mistreatment. International cooperation on voluntary quality control schemes for AEDs has improved the analytical performance of many laboratories engaged in TDM.

Pitfalls in therapeutic drug management of AEDs

While the degree of seizure control and toxicity varies widely among patients with the same drug levels, a correlation generally exists between efficacy and toxicity of AEDs and their serum level for an individual patient. There is not a therapeutic or optimum drug level that applies to all patients, and an individual's optimum drug level depends partly on severity of their epilepsy and partly on their pharmacodynamic response to a drug. It is the patient that is being treated, not the serum drug level, and TDM is not a substitute for clinical judgment.

A serum level evaluated on a single sample may be misleading for drugs with large diurnal fluctuations, e.g. carbamazepine and valproate, especially if sustained release preparations are not used. Therefore, it is important to standardise blood sampling time whenever possible. If transient side-effects related to peak level are suspected, a kinetic profile with a sequence of measurements throughout a dosage interval will provide more information than a single trough level.

One should always consider the analytical difficulties associated with determination of AEDs. Accuracy may be a problem in some laboratories despite quality control programmes, and if unexpected values are reported, repeated measurements should be undertaken before taking clinical action.

Conclusions

Emphasis should be placed on rational and cost effective TDM. Methods that produce rapid results are of greater relevance and lead to more efficient patient care than assays that involve time lapses of several days before the clinician can take action.

For the older AEDs, the reference range and place of serum drug level monitoring were established long after the drugs were introduced. Many newer AEDs have been approved in recent years and others are in clinical trials. The role of TDM for many of these drugs is still being evaluated, although for some, e.g. lamotrigine, the case for measuring is now very strong. Development and testing of new AEDs should include an evaluation of TDM as early as possible in specifically designed clinical trials, preferably of monotherapy.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ АНТИКОНВУЛЬСИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЛЕЧЕНИИ ЭПИЛЕПСИИ

ДЕВИД БЕРРИ

Отдел медицинской токсикологии, Гай госпиталь и больница Святого Томаса,
Лондон, Великобритания

Резюме. *Считается, что терапевтический эффект большинства антиэпилептических препаратов (АЭП) достигается в пределах специфического уровня концентрации препаратов в плазме. Низкие уровни концентрации применяемых препаратов могут приводить к неадекватному ответу, а высокие — к развитию нежелательных побочных эффектов. Существует значительная разница в чувствительности к применяемому лекарству у различных пациентов, при этом необходимая доза для достижения референтного интервала может быть очень значительной. Кроме того, для многих рефрактерных к препаратам пациентов необходима терапия с применением нескольких препаратов, что может привести к межлекарственному фармакокинетическому взаимодействию, так же, как и при лечении сопутствующих заболеваний. Мониторинг концентрации АЭП в сыворотке/плазме крови показал себя очень эффективным средством персонализированной терапии. В настоящее время доступно большое количество АЭП, и необходимо количественно определить уровень каждого назначенного пациенту препарата. Методы исследования включают ряд хроматографических процедур и специфические иммунологические исследования, хотя последние в настоящее время не применяются для измерения уровня всех известных АЭП.*

Ключевые слова: *эпилепсия, лекарственный мониторинг, терапевтический лекарственный менеджмент, антиэпилептические препараты, персонализированная терапия.*

Рекомендации по рациональному определению уровня антиэпилептических средств в сыворотке

Роль мониторинга уровня лекарственных препаратов при эпилепсии определяется как факторами, имеющими отношение к течению эпилепсии, так и свойствами различных АЭП. В связи с тем, что лечение является профилактическим, и судорожный синдром может иметь место с нерегулярными интервалами, достаточно трудным является поиск оптимальной дозы на основании только клинического подхода к лечению. Кроме того, признаки интоксикации могут быть малозаметными, их достаточно трудно определить, особенно у пациентов, у которых развиваются нарушения ментальной сферы. Хроническое, часто пожизненное, лечение также делает особенно важным мониторинг терапии с целью уменьшения риска побочных эффектов, связанных с длительным применением препаратов. Эти аргументы в пользу мониторинга уровня лекарственных препаратов при эпилепсии являются общими для всех АЭП и не зависят от характера назначаемых препаратов.

Применение мониторинга уровня лекарственных препаратов зависит от фармакологических свойств исследуемых препаратов и наиболее важно в следующих случаях:

- 1) когда имеется значимая вариабельность фармакокинетики у различных индивидов,
- 2) фармакокинетика у отдельных пациентов может изменяться из-за межлекарственных взаимодействий, сопутствующей патологии и других состояний, и
- 3) имеется установленная корреляция между концентрацией препарата и его терапевтическим и токсическим эффектом, при этом рамки, в которых проявляется терапевтический эффект, являются очень узкими.

Предпосылкой для использования мониторинга уровня препаратов для контроля терапии является существование более тесной связи между уровнем сывороточной концентрации активного препарата и проявляемыми им эффектами, чем между дозой и эффектами препарата. Некоторые фармакологические требования должны быть выполнены для достижения значимых взаимоотношений между сывороточной концентрацией и эффектом препарата:

- 1) препарат должен иметь обратимое действие,
- 2) не должно иметь место развитие толерантности,
- 3) в случае, если эффект препарата опосредован действием его метаболитов, необходимо также, чтобы их уровень мог быть определен,
- 4) концентрация несвязанного лекарственного препарата в месте забора должна быть в идеале равной несвязанной концентрации его в месте нахождения рецептора.

Таким образом, условия применения мониторинга лекарственных препаратов одинаковы для всех АЭП, в то же время значимость этого метода может быть различной у разных АЭП в зависимости от их фармакологических и фармакокинетических свойств.

Таким образом, условия применения мониторинга лекарственных препаратов одинаковы для всех АЭП, в то же время значимость этого метода может быть различной у разных АЭП в зависимости от их фармакологических и фармакокинетических свойств.

Таким образом, условия применения мониторинга лекарственных препаратов одинаковы для всех АЭП, в то же время значимость этого метода может быть различной у разных АЭП в зависимости от их фармакологических и фармакокинетических свойств.

Референтный интервал уровня АЭП в сыворотке

Большинство более старых АЭП имеют достаточно хорошо определенные референтные интервалы в сыворотке (табл. 1). Эти уровни не должны интерпретироваться слишком строго, т. к. многие из проведенных в тот период исследований включали пациентов с тяжелым течением эпилепсии, получавших лечение несколь-

Фармакокинетика основных антиэпилептических препаратов

Препарат		Элиминация (период полужизни) (часы)	Время достижения устойчивого состояния (дни)	Референтный интервал (mg/L)
Более старые препараты				
Carbamazepine	Карбамазепин	8–20	5–10	1,5–9
Clobazam + DCLB	Клобазам + DCLB	24–48	5–10	<0,2+< 2,0
Clonazepam	Клоназепам	20–60	5–10	0,025–0,075
Ethosuximide	Этосуксимид	40–60	5–10	40–80
Phenobarbitone	Фенобарбитон	50–160	10–35	5–30
Phenytoin	Фенитоин	7–60 ^a	4–8	7–20
Primidone	Примидон	4–12	1–3	<13
Valproic acid	Валпроиновая кислота	11–20	2–4	50–100
Новые препараты				
Felbamate	Фелбамат	14–22	305	10–100
Gabapentin	Габапентин	5–7	2	2–20
Lamotrigine	Ламотриджин	8–33	3–15	3–15
Levetiracetam	Леветирацетам	6–8	2	6–20
Oxcarbazepine ^b	Окскарбазепин	8–15	2–3	10–35
Tiagabine	Тиагабин	7–9	2	10–100
Vigabatrin	Вигабатрин	5–7	1–2	1–35
Topiramate	Топирамат	20–30	4–6	5–20
Zonisamide	Зонисамид	50–70	10–15	10–40

^a — зависит от концентрации

^b — моногидроксидериват

кими АЭП. В то же время в современных контролируемых исследованиях, относящихся к лечению впервые выявленной или менее тяжелой эпилепсии, оптимальный режим лечения большей части пациентов чаще включает один лекарственный препарат с мониторингом его уровня в сыворотке.

Контроль судорожного синдрома у больных с легким течением эпилепсии часто достигается при уровнях препарата более низких, чем обычно рекомендуемый, в то же время пациенты с тяжелым течением зачастую требуют «сверхтерапевтических» уровней для достижения оптимального эффекта. Кроме того, необходимый уровень препарата в сыворотке зависит от типа судорожного синдрома, таким образом, доза должна титроваться до достижения «оптимального сывороточного уровня» для каждого пациента.

Референтные интервалы для более старых АЭП достаточно хорошо определены (табл. 1), но уровни для новых АЭП определены значительно хуже, и требуются дальнейшие исследования для определения роли, которую может играть терапевтический мониторинг

лекарственных препаратов при применении новейших средств фармакологии. Достаточно большой объем информации доступен в отношении ламотриджина, для большинства других новейших препаратов существуют данные в отношении связи рационального уровня сывороточной концентрации и терапевтического ответа на препарат. Мониторинг уровня препаратов в сыворотке крови может также быть необходимым в случае нежелания пациента получать необходимую терапию.

В таблице 1 приведены референтные интервалы для новейших АЭП, определенные согласно существующим на настоящий момент данным. Для уточнения их концентраций необходимы дальнейшие исследования. Как указывалось ранее, контроль судорожного синдрома, как правило, имеет место в рамках достаточно широкого уровня сывороточной концентрации АЭП при наличии значимого перекреста с концентрациями, отмеченными у резистентных пациентов и пациентов, у которых выявлены побочные эффекты (т. е. резистентность и побочные эффекты могут иметь место при тех же концен-

трациях, при которых у других пациентов отмечается терапевтический эффект).

Складывается впечатление, что для новейших препаратов оптимальная концентрация является индивидуальной и может значительно варьировать от пациента к пациенту (как это наблюдалось у АЭП прошлого поколения).

Связь между дозой и уровнем в сыворотке

Биодоступность АЭП варьирует не только в зависимости от способа назначения, но также в зависимости от пациента и лекарственного препарата. Как правило, препараты назначаются перорально, но иногда могут применяться внутривенно, внутримышечно и ректально. После перорального приема максимальная сывороточная концентрация для большинства препаратов достигается в течение 2–8 часов, на скорость и степень абсорбции препарата может влиять ряд факторов:

Тип препарата и его формула

Скорость абсорбции и биодоступность могут зависеть от биофармацевтической формулы и различаться между оригинальными и генерическими препаратами. Переход на препарат с лучшей биодоступностью может привести к избыточному возрастанию сывороточного уровня и риску лекарственной интоксикации. В то же время переход на АЭП с меньшей биодоступностью может привести к недостаточному сывороточному уровню и возрастанию частоты судорожных эпизодов.

Эффекты питания

Биодоступность и скорость абсорбции некоторых АЭП может быть более высокой в случае голодания, для других имеет место противоположный характер взаимосвязи.

Связывание белками и распределение лекарственных препаратов

После поступления в циркуляцию многие АЭП частично связываются с сывороточными белками, и устанавливается равновесие между свободной и связанной фракциями. Только свободная фракция препарата может проходить через биологические мембраны и взаимодействовать со специфическими рецепторами головного мозга. Существует динамическое равновесие между концентрацией препарата в плазме и во внеклеточной жидкости головного мозга, концентрация препарата в плазме может рассматриваться как отражающая таковую в головном мозге, т. е. в месте оказания непосредственного антиэпилептического эффекта. Степень связывания с белками различается у различных препаратов и в норме постоянна для каждого конкретного препарата у данного пациента. Уменьшение степени связывания может иметь клинические последствия, особенно у препаратов, которые более сильно связываются с белками, как фенитоин, валпроат и тиагабин.

Факторы, определяющие устойчивость концентрации в сыворотке

Отношение между клиническим эффектом и уровнем препарата в сыворотке определяется при условиях наличия устойчивого состояния. Время, необходимое для достижения устойчивого состояния после начала терапии или изменения дозы, зависит от периода полупериода элиминации препарата из плазмы ($t_{1/2}$) (табл. 1). Теоретически, 97% итогового устойчивого уровня достигается после пяти периодов полужизни. Для большинства АЭП первый забор крови должен быть проведен через 1–2 недели после начала терапии или смены дозы; в этот период достигается устойчивое состояние. Исключением является фенobarбитон, для которого из-за длительного периода полужизни устойчивое состояние достигается в период 3–4 недели. Часть АЭП, в особенности карбамазепин, увеличивают свой собственный метаболизм (автоиндукция), что приводит к уменьшению сывороточной концентрации в начальный период лечения. Также необходимо определенное время для адаптации пациента к оптимальному содержанию препарата в сыворотке и, следовательно, проявлению оптимального клинического эффекта. В целом, доза всех АЭП должна увеличиваться постепенно, для того чтобы было достаточно времени для оценки клинического эффекта и ограничения побочных реакций.

В связи с рядом индивидуальных факторов скорость элиминации может различаться у различных пациентов, что обусловлено генетическими факторами, межлекарственными взаимодействиями, возрастом, сопутствующими заболеваниями. Все указанные факторы влияют на распределение лекарственного препарата. Женщины детородного возраста имеют более высокую скорость метаболизма препаратов по сравнению с мужчинами, скорость метаболизма уменьшается с возрастом у обоих полов. Детям, как правило, требуются большие дозы препаратов (в мг/кг массы тела) по сравнению со взрослыми для достижения сравнимых сывороточных концентраций. Кроме того, заболевания почек, печени и сердечно-сосудистой системы могут влиять на элиминацию лекарственных препаратов и их связывание с белками; степень этого влияния является клинически значимой.

Межлекарственные взаимодействия

В случаях, когда пациент получает более одного лекарственного препарата, может возникать взаимодействие между препаратами, что оказывает влияние на результаты лечения. Эти взаимодействия могут затрагивать абсорбцию, связывание с белками, взаимодействие с рецепторами, метаболизм или экскрецию терапевтического агента. Наиболее частые виды взаимодействия относятся к скорости биотрансформации вследствие индукции или угнетения ферментов. Взаимодействия между различными АЭП, а также между АЭП и другими

лекарственными препаратами возникают достаточно часто. В результате может иметь место или снижение сывороточного уровня АЭП и меньшая эффективность лечения, или повышение сывороточной концентрации и увеличение частоты побочных эффектов. В случае длительной терапии эпилепсии необходимо избегать возможных межлекарственных взаимодействий, т. к., несмотря на то, что часть таких взаимодействий не является клинически значимой, некоторые из них могут привести к значительным изменениям клинического состояния пациента. Существуют значительные индивидуальные различия в выраженности межлекарственных взаимодействий, и при этом затруднительно давать какие-либо рекомендации. В случае применения комбинации лекарственных препаратов, при которых могут иметь место значительные межлекарственные взаимодействия, необходимо оценить, имеет ли место снижение эффективности лечения или появление признаков лекарственной интоксикации. Необходим также мониторинг уровня лекарственных препаратов до, через 2 и 4 недели после добавления или отмены препарата. Если имеет место появление признаков интоксикации при невозможности отмены вновь добавляемого препарата, доза исходного препарата должна быть снижена для получения начального уровня концентрации его в плазме.

Что измерять?

Общая концентрация сыворотки крови по сравнению с концентрацией свободной фракции препарата

В то время как идеальным для измерения является уровень свободной, т. е. активной, фракции препарата, существующие аналитические методы позволяют в основном измерить общую концентрацию АЭП в сыворотке. Важным условием для использования общей сывороточной концентрации для оценки возможных терапевтических или токсических эффектов является то, что степень связывания АЭП с белком должна быть постоянной для отдельного пациента и аналогичной (или сходной) для всех пациентов. Степень связывания с белками, различается у различных препаратов, что зависит от физических и химических свойств препарата, а также физических свойств белков. Лекарственный препарат может быть либо сильно, либо слабо связан с белками, и его высвобождение может привести к появлению токсических эффектов из-за возрастания свободной концентрации в плазме, в то время как общий уровень сохраняется постоянным. В норме степень связывания является постоянной, однако уменьшение связывания может иметь при ряде состояний, например уремии (за счет эндогенных факторов, замещающих лекарственные препараты в их связи с белками). Это может быть важно для сильно связываемых препаратов, как фенитоин. Пациенты с гипоальбуминемией, в особенности новорожденные с гипербилирубинемией, имеют сниженную связывающую способность, что уве-

личивает свободную (т. е. активную) фракцию препарата в крови. Повышение свободной фракции может привести либо к увеличению эффективности, либо к появлению токсических эффектов при более низких сывороточных концентрациях, чем ожидалось. Существует ряд лабораторных методов, позволяющих разделять свободную и связанную фракции и отдельно определять уровень свободной фракции.

В настоящий момент мониторинг свободной фракции не является рутинным методом, и ее определение должно проводиться только в сложных случаях. Особенно полезным было бы определение свободной фракции у пациентов, не отвечающих на терапию АЭП в связи с нарушением связывания препарата белками или наличием межлекарственных взаимодействий, а также в связи с наличием специфических физиологических или патологических состояний, таких как беременность, печеночная или почечная недостаточность и т. д.

Оценка других биоматериалов

Для большинства АЭП уровень свободной фракции препарата также может быть определен в спинно-мозговой жидкости, слюне и слезной жидкости. Доступ к получению проб спинно-мозговой жидкости, как правило, ограничен; исследования слезной жидкости проводятся редко, в то же время слюна может рассматриваться в качестве альтернативной биологической жидкости, т. к. концентрация препарата в ней отражает уровень свободной фракции его в сыворотке. Необходимо соблюдение ряда мер предосторожности при сборе биоматериала с целью избежания контаминации, но при хорошо контролируемых условиях сбора слюны может быть полезной для определения не связанной с белком фракции препарата в случаях, когда подозревается изменение степени связывания. Кроме того, т. к. сбор слюны неинвазивен, этот подход может быть ценным в случаях, если требуются множественные повторные пробы, особенно у детей.

Метаболиты

Дальнейшее исследование терапевтического мониторинга лекарственных препаратов необходимо в случаях, когда существуют фармакологически активные метаболиты. Роль части метаболитов недостаточно ясна в настоящий момент. В то же время известно, что примидон быстро трансформируется в фенилетмалонамид (РЕМА) и более медленно в фенobarбитон. В связи с этим мониторинг концентрации фенobarбитона является наиболее ценным, и в ряде случаев необходимо также мониторинг концентрации примидона. Мониторинг РЕМА в большинстве случаев не требуется.

Карбамазепин метаболизируется с образованием фармакологически эквивалентного 10,11-эпоксида и неактивного 10,11-трансдиола. Уровень эпоксида обыч-

но составляет 5–30% уровня исходного препарата в сыворотке пациента, в то время как степень связывания с белками на 10–20% ниже, что приводит к возрастанию фармакологического эффекта. Однако часть пациентов аккумулирует значительную часть эпоксида, в особенности в случае одновременного назначения валпроата. В этих случаях определение сывороточного уровня могло бы быть полезным. Окскарбазепин, кетодериват карбамазепина, быстро трансформируется в фармакологически активный 10-гидроксикарбамазепин, который накапливается в плазме и обуславливает антиконвульсантный эффект препарата. В связи с этим желательным является мониторинг уровня этого метаболита, в то же время сывороточный уровень исходного препарата не является значимым. Клобазам в значительной степени метаболизирует в фармакологически активный десметилклобазам (DCLB), который более медленно элиминируется по сравнению с исходным препаратом (40 часов vs. 20 часов). Таким образом, необходимо определение в сыворотке DCLB, т. к. сывороточный уровень его более высок по сравнению с клобазамом и, следовательно, обуславливает основные фармакологические эффекты.

Когда должны измеряться уровни сывороточных АЭП?

Проблема терапевтического мониторинга АЭП, применяющихся в течение длительного времени, является важным вопросом проводимого лечения. Клинические ситуации, в которых производится мониторинг, и показания для измерения могут меняться в зависимости от фармацевтических особенностей АЭП, но в то же время можно сформулировать ряд общих принципов, которыми следует руководствоваться:

Начало лекарственной терапии, подбор дозы и переход к терапии несколькими препаратами (введение новых препаратов)

В течение 2–3 недель после начала лекарственной терапии, когда достигается устойчивое состояние, необходимо измерение сывороточного уровня лекарственного препарата и сопоставление его с клиническим эффектом. Это позволит оценить, является ли используемая доза оптимальной, что особенно важно для АЭП с узким и хорошо определенным терапевтическим интервалом. Однако уровень лекарственных препаратов для большинства АЭП, измеренный в этот момент, будет в большей степени значим для дальнейшего лечения, в особенности в случае неэффективности терапии. Подбор дозы — это еще одно показание для мониторинга, в особенности для АЭП с дозозависимой кинетикой. Обязательным мониторинг является при подборе дозы фенитоина и добавлении к терапии новых препаратов, которые могут привести к межлекарственным взаимодействиям.

Контрольные измерения

Контрольное определение уровня сывороточных АЭП необходимо, т. к. дает основание для сравнения в случае изменения клинической ситуации. У взрослых с хорошо контролируемым судорожным синдромом уровень препаратов должен определяться один раз в год на ежегодном осмотре. У детей определение должно проводиться чаще, т. к. в процессе роста изменение метаболизма лекарственного препарата является ожидаемым. Частый мониторинг необходим в начале пубертатного периода, т. к. изменение метаболизма в этот период происходит достаточно быстро, что может привести к ухудшению контроля над судорожным синдромом за счет изменения метаболизма препарата и увеличения массы тела. В случае если АЭП применяются при судорожных припадках новорожденных, необходим наиболее частый мониторинг для достижения контроля за этой наиболее опасной ситуацией, в особенности в случае, если новорожденный недоношенный.

Неэффективность терапии, токсичность и несоблюдение режима приема препарата

Несоблюдение режима приема препарата пациентами с эпилепсией является достаточно частым, и это может привести к неадекватному сывороточному уровню препарата. Низкий сывороточный уровень может также определяться в случае недостаточности назначенной дозы, а также в случае высокой скорости метаболизма (генетическая особенность пациента или индукция метаболизма). Соответственно, высокий уровень препарата может быть обусловлен слишком высокой назначенной дозой, а также низкой скоростью метаболизма (генетическая особенность пациента или угнетение метаболизма препарата). В случае если сывороточная концентрация превышена, может быть необходима отмена препарата на несколько дней и возобновление терапии с более низкой дозы по возвращении концентрации препарата в крови к необходимому (терапевтическому) уровню.

Другие заболевания и сопутствующая патология

Мониторинг препаратов необходим у пациентов с сопутствующей патологией, в том числе получающих по поводу этой патологии лечение препаратами, которые могут влиять на метаболизм АЭП (например, инфекции, длительная диарея и т. д.). Жизненно необходимым является терапевтический мониторинг лекарственных препаратов для пациентов с заболеваниями печени и почек, т. к. фармакокинетика препаратов может быть значительно нарушена. У пациентов с заболеваниями печени возможности печеночных ферментов, осуществляющих метаболизм лекарственных препаратов, могут быть значительно нарушены, имеет место также снижение связывания с белками в крови.

Таким образом, за счет влияния всех этих факторов общий клиренс лекарств может быть очень значительно нарушен, и необходимо параллельное мониторирование сывороточного уровня и клиническое наблюдение пациента.

В случае сопутствующих заболеваний почек клиническая картина может значительно различаться, и эффект на метаболизм АЭП может быть различен у различных пациентов. При нарушениях функции почек несвязанная фракция фенитоина и валпроата повышается у всех пациентов, но снижение дозы редко бывает необходимым, поскольку в этом случае увеличивается клиренс лекарственного препарата, и терапевтический эффект часто наблюдается при более низких сывороточных концентрациях. Риск возникновения побочных эффектов при межлекарственных взаимодействиях в целом возрастает у пациентов с заболеваниями почек и печени.

Беременность

Беременность — это особая ситуация, в которой очень важным является, с одной стороны, хороший контроль над судорожным синдромом, с другой стороны — избежание возможных побочных эффектов лечения для матери и плода. Беременным женщинам необходимо назначать наиболее простой режим терапии АЭП; все значительные изменения терапии должны производиться в период до зачатия. Уровень препарата должен постоянно мониторироваться для определения минимальной дозы, способной поддерживать достаточный для эффективной терапии сывороточный уровень препарата и, в то же время, сохранять риск вызванных препаратами аномалий плода на минимальном уровне.

Фармакокинетические параметры большинства АЭП могут значительно меняться в течение беременности, что приводит к снижению сывороточного уровня, наблюдаемого в устойчивом состоянии, может возрастать также доля не связанного с белками препарата. В связи с этим необходимо регулярное измерение в период беременности не только общего сывороточного уровня АЭП, но также и уровня свободного препарата, что возможно для части АЭП. В случае если в течение беременности производилось увеличение дозы препарата, необходимо вернуться к прежней дозе, которая была до беременности, в течение первых недель послеродового периода с целью избежания токсических эффектов; уровень АЭП должен контролироваться периодически как минимум в течение первых 2 месяцев после родов.

Определение препарата

Забор крови

Время забора крови должно быть стандартным для обеспечения сравнимых условий. В идеале, образцы

должны быть взяты до приема утренней дозы, прием которой, в случае необходимости, может быть несколько отсрочен. Это в наибольшей степени важно для валпроата и других препаратов с коротким периодом полужизни, т. к. имеется значительное различие уровня препарата в сыворотке между приемами. В случае подозрения на токсический эффект препарата в период между приемами, наилучшим является забор крови в период, когда токсические симптомы наиболее выражены; в то же время референтные интервалы препаратов известны также для определенного (базового) временного промежутка. Для правильной интерпретации результата оценки уровня лекарственного препарата необходима полная информация о пациенте (возраст, вес, пол, диагноз, показание для анализа, клинические особенности, все применяемые препараты с указанием общей суточной дозы, время забора крови и время последнего приема препарата).

Методы определения

Существует ряд аналитических методов для определения уровня АЭП в биологических образцах, включая газовую хроматографию, жидкостную хроматографию и иммунологические методы. Аналитически более простым является определение одного лекарства, а не смеси лекарств, однако при рефрактерности пациента к лечению (случаи, требующие наиболее интенсивного мониторинга), как правило, имеет место назначение более одного препарата, и наиболее полезным с терапевтической точки зрения является определение нескольких препаратов в одном образце. Хроматографические методы могут применяться для анализа нескольких препаратов в образце, в последнее время наиболее предпочтительной техникой становится LC/MS/MS.

Иммунологические методы, которые дают возможность специфически измерить отдельный препарат, часто являются доступными для разных лабораторий, но зачастую сфера применения ограничена в связи с тем, что наборы для измерения существуют в основном для более старых препаратов. В последнее время началась разработка наборов для определения некоторых новых препаратов. Преимущества иммунологических методов в том, что они позволяют сравнительно мало-квалифицированному персоналу получить точный и высоковоспроизводимый результат анализа, используя только один образец с небольшим количеством материала. Хроматографические методы требуют более специализированных лабораторий и высококвалифицированных сотрудников, в то же время имеются наборы для определения всех известных препаратов. Значительным преимуществом хроматографии является возможность ее использования в качестве скрининга, т. е. определения препаратов, об использовании которых пациентом врач не знает (подобная ситуация не является редкой).

Контроль качества

Наиболее важным для обеспечения точных результатов анализа является участие ответственного лица лаборатории как в процедурах, относящихся к внешней оценке качества, так и в системе внутреннего контроля. Отличное качество анализа жизненно необходимо для эффективного терапевтического мониторинга лекарственного препарата; недостаточное качество может привести к неправильному лечению больного. Международное сотрудничество и участие в системе контроля качества для АЭП значительно улучшило качество результатов анализа во многих лабораториях, использующих терапевтический мониторинг лекарственных препаратов.

Проблемные вопросы терапевтического мониторинга АЭП

Несмотря на то, что степень контроля судорожного синдрома и токсичность в значительной степени варьируют у разных пациентов с одинаковым сывороточным уровнем, в целом существует корреляция между эффективностью АЭП, его токсичностью и сывороточным уровнем препарата у индивидуального пациента. Не существует терапевтического или оптимального уровня препарата, применимого для всех пациентов, а оптимальный уровень для конкретного пациента зависит частично от тяжести течения эпилепсии, частично от фармакодинамического ответа на препарат. Основой для дальнейшей тактики является, прежде всего, клиническая оценка, которую не могут заменить определение сывороточного уровня и терапевтический лекарственный мониторинг.

Сывороточный уровень, определенный в одном образце, может дать неправильную информацию в случае использования препаратов со значительным колебанием уровня в течение дня (карбамазепин и валпроат), в особенности, если не используются препараты с замедленным высвобождением. В связи с этим важной является стандартизация времени забора крови в случаях, когда

это возможно. В случае возникновения побочных эффектов предположительно в период, когда в крови отмечается пиковый уровень препарата, необходимо определение кинетического профиля с последовательным измерением в течение дня между приемами препарата. Это поможет получить значительно больше информации, чем однократное определение.

Также необходимо учитывать аналитические трудности, связанные с определением АЭП. Точность и аккуратность может быть проблемой в части лабораторий, несмотря на внедрение программ контроля качества. В случае получения неожиданных уровней препарата в крови необходимо до принятия каких-либо клинических решений провести повторное исследование.

Выводы

Акцент необходимо сделать на рациональном и финансово эффективном терапевтическом лекарственном менеджменте. Методы, обеспечивающие быстрые результаты, являются более выгодными и приводят к более эффективному лечению пациентов по сравнению с методами, требующими временного промежутка в течение нескольких дней, что может привести к задержке лечебных мероприятий на тот же период.

Для более старых АЭП референтный интервал и место сывороточного лекарственного мониторинга были определены значительно позже появления самих лекарств. Многие новейшие лекарственные препараты введены в последние годы, ряд других находится в процессе клинических испытаний. Роль терапевтического лекарственного менеджмента для многих из этих препаратов пока еще находится в процессе изучения, в то время как для некоторых (ламотриджин) существуют значительные доводы в пользу мониторинга. Внедрение и апробация новых АЭП также должна включать оценку процедуры терапевтического лекарственного мониторинга, причем эта оценка должна производиться как можно раньше, в ходе проведения специальных клинических исследований, в особенности в режиме монотерапии.

Российская Ассоциация лабораторной диагностики

ТЕПЕРЬ МЫ БЛИЖЕ:

www.ralm.ru

ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРА РОНКОЛЕЙКИНА У БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ В СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ. КОНСИЛИУМ У ПОСТЕЛИ БОЛЬНОГО

К. В. ШЁКОТОВ*, И. М. БАРБАС*, А. М. ПОПОВИЧ***, А. А. СКОРОМЕЦ*, М. Н. СМЕРНОВ**

* ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Росздрава, кафедра неврологии с клиникой

** СПбГУ, лаборатория биохимической генетики — ТОО «Биотех»

*** ГОУ ДПО СПбМАПО, кафедра терапии ^о 1 имени Э. Э. Эйхвальда

Резюме. Проанализированы теоретические возможности применения препарата интерлейкина-2 (ронколейкина) у больных с обострением рассеянного склероза, подтверждающие практические данные о клинической и иммунологической эффективности этого препарата.

Ключевые слова: интерлейкин-2, ронколейкин, рассеянный склероз.

ARGUMENTS FOR IMMUNE MODULATOR RONKOLEUKIN USE IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS EXACERBATION. CONSILIUM IN PATIENT'S WARD

K. V. SHCHEKOTOV*, I. M. BARBAS*, A. M. POPOVICH***, A. A. SKOROMETZ*, M. N. SMIRNOV**

* State Educational Institution of Higher Professional Education «Saint-Petersburg I. P. Pavlov State Medical University», Federal Agency for Health Care and Social Development, department of neurology

** Saint-Peterburg State University, Medical Genetics Laboratory, «Biotech»

*** State Educational Institution of Additional Professional Training «Saint-Peterburg Medical Academy of Postgraduated Education», Eichwald's Department of Therapy N 1

Summary. Theoretical possibilities of Interleukin-2 preparation (ronkoleukin) use in patients with multiple sclerosis exacerbation were analyzed. The results of analysis confirm the data about clinical and immunological efficacy of this drug, obtained by practical investigators.

Key words: interleukin-2, ronkoleukin, multiple sclerosis.

Благодаря успехам в развитии патогенеза иммуно-аллергических заболеваний появляется новое направление в лечении этих болезней — иммуномодулирующая терапия.

Выявился ряд цитокинов, являющихся модуляторами иммунного ответа. Цитокины регулируют разнообразные функции иммунных клеток. К ним относятся интерлейкины, интерфероны, колониестимулирующие факторы, трансформирующие факторы роста, факторы некроза опухолей. Среди цитокинов определяющим развитие клеточного и гуморального иммунитета является интерлейкин-2 [1, 7].

Интерлейкин-2 — это полипептид с молекулярным весом 15 300 Да, состоящий из 133 аминокислот. Он синтезируется хелперными лимфоцитами Тх0 и Тх1 в ответ на антигенную стимуляцию, а также цитотоксическими лимфоцитами [7, 11, 13, 15].

Интерлейкин-2 является ключевым цитокином, инициирующим развитие специфического иммунного ответа. Он направленно влияет на рост, дифференцировку и активацию Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, олигодендроглиальных клеток, эпидермаль-

ных клеток Лангерганса. Интерлейкин-2 ускоряет продукцию и секрецию не менее десятка других цитокинов: интерлейкинов, интерферонов, колониестимулирующих факторов и т. д., продукцию иммуноглобулинов. Интерлейкин-2 вызывает образование лимфокин-активированных клеток и опухолинфильтрирующих лимфоцитов. От его присутствия зависит развитие цитолитической активности натуральных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов. Это обуславливает элиминацию разнообразных патогенных микроорганизмов, инфицированных и малигнизированных клеток [1, 7].

Таким образом, интерлейкин-2 является плейотропным цитокином, имеет основное значение как ростовой фактор, оказывает влияние на неспецифическое (натуральные киллеры и моноциты) звено иммунитета и на специфический антигензависимый иммунный ответ, реализующийся через Т- и В-лимфоциты [7].

Нами использовался интерлейкин-2 (ронколейкин), синтезированный фирмой «Биотех», в инъекционной лекарственной форме. Клетками-продуцентами для его получения является рекомбинантный штамм непатоген-

ных пекарских дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*, в генетический аппарат которого встроен ген человеческого интерлейкина-2. Ронколейкин — полный структурный и функциональный аналог эндогенного интерлейкина-2 [1, 5, 8].

Под нашим наблюдением было 54 больных в возрасте от 19 до 54 лет (37 женщин, 17 мужчин) с клиническими признаками обострения рассеянного склероза.

Всем больным вводили ронколейкин в дозе 1 млн ЕД, в 400 мл физиологического раствора внутривенно капельно.

У 25 больных (44,4%) через сутки отмечено улучшение неврологического статуса с 6,0 до 4,0 баллов по шкале EDSS. Уменьшился пирамидно-мозжечковый синдром, атаксия. Регрессировали глазодвигательные расстройства. Улучшилась функция тазовых органов. У больных с повышенным цитозом в церебро-спинальной жидкости он уменьшился до нормы.

У 31 пациента отмечено увеличение общего числа Т-лимфоцитов и Т-хелперов, увеличение коэффициента CD4/CD8, увеличение рецепторов к интерлейкину-2 — CD25, В-лимфоцитов и натуральных киллеров — CD56 (табл. 1) [1].

Для иллюстрации клинической эффективности терапии ронколейкином обострения заболевания приводим одно из наших наблюдений.

Больная С. О.А., 1973 года рождения, неработающая, находилась в клинике неврологии СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова с 27.07.05 по 19.08.05 (и/б № 12105) с диагнозом рассеянный склероз в стадии обострения.

Поступила с жалобами на двоение предметов перед глазами при взгляде прямо и влево, слабость в ногах, тазовые расстройства.

Считает себя больной с марта 1991 г., когда заметила «пелену» перед глазами. Симптом спонтанно регрессировал спустя 2 недели. До 1997 годы трижды были обострения в виде онемения кистей и стоп.

С 1998 по 1999 гг. получала препарат интерферона-β, а с 2001 по 2004 гг. курс глатирамера ацетата. Обострений не отмечала.

14 июня 2005 г. почувствовала общую слабость, затруднение мочеиспускания, подъем температуры тела до 37,5°С. 18 июня появилось онемение и слабость в ногах. 25 июня присоединилось двоение предметов перед глазами при взгляде прямо и влево, слабость в руках, слабость в ногах наросла до плегии. В связи с чем была госпитализирована.

Неврологический статус при поступлении

Легкое оглушение. Отдельные мозговые функции не нарушены. Гемипарезов нет. Зрачки симметричные, среднего диаметра. Фотореакции сохранены. Сходящееся косоглазие за счет левого глазного яблока. Не ведет левый глаз кнаружи. Диплопия по горизонтали, усиливающаяся при взгляде влево. Чувствительность на лице сохранена. Лицо симметричное. Поперхивание при глотании. Дизартрия. Язычок расположен по средней линии, плохо поднимается при фонации. Язык по средней линии. Симптомы орального автоматизма. Пассивные движения в конечностях ограничены из-за высокого мышечного тонуса. Снижение мышечной силы в сгибателях предплечья и кисти, в межкостных мышцах до 3 баллов с обеих сторон; до плегии в ногах. Мышечный тонус в конечностях умеренно повышен по пирамидному типу, больше в ногах, в разги-

Таблица 1

Динамика иммунологических показателей при лечении ронколейкином больных рассеянным склерозом в стадии обострения (n = 31)

Показатель	Ронколейкин							
	До лечения				После лечения			
	↓	=	↑	итого	↓	=	↑	итого
CD3	26	5	0	↓	8	7	16	↑
CD4	6	25	0	=	4	13	14	↑
CD8	0	29	2	=	10	12	9	=
CD4/CD8	21	10	0	↓	8	4	18	↑
CD25	2	16	13	↑	9	9	13	↑
HLA-DR	1	5	3	=	1	2	6	↑
CD20	0	8	12	↑	4	6	8	↑
CD56	0	20	9	↑	4	5	20	↑

Условные обозначения:

↓ — уменьшенное количество иммунологических показателей;

↑ — увеличенное количество иммунологических показателей;

= — нормальное содержание иммунологических показателей.

бателях голени и сгибателях стопы с двух сторон. Глубокие рефлексы на руках симметрично повышены. Коленные и ахилловы оживлены до клонуса стоп, ярче справа. Патологические симптомы Россолимо-Вендеровича, Бабинского, Чеддока с обеих сторон. Брюшные рефлексы не вызываются с двух сторон. Расстройство поверхностной чувствительности в виде проводниковой парагипестезии с уровня D2. Снижение вибрационной чувствительности до 3–4 с. в руках, до анестезии в ногах. Координаторные пробы выполняет верхними конечностями с атаксией, в ногах не оценить из-за пlegии. Нарушения функции тазовых органов по типу задержки мочи и стула. Ограничена постелью большую часть дня, отчасти эффективно использует руки, сохраняет некоторые функции по самообслуживанию. Оценка по расширенной шкале инвалидизации Курцке (EDSS) — 8,5.

Глазное дно: частичная атрофия дисков зрительных нервов с двух сторон.

Церебро-спинальная жидкость: белок 0,2%, цитоз 134/3, из них 126 лимфоцитов.

В ликворе был повышен уровень свободных легких цепей Ig G каппа типа до 1,5 (при норме до 0,04) и лямбда типа до 0,068 (при норме до 0,02).

Проводилась дезинтоксикационная, антибиотикотерапия, больная получала глюкокортикостероиды. На фоне лечения уменьшились проявления интоксикационного синдрома, однако сохранялась неврологическая симптоматика. Больной был назначен препарат липоевой кислоты в дозе 600 мг внутривенно капельно № 10. Больная отмечала незначительное улучшение чувствительности в руках.

В связи с выраженностью неврологического дефицита больной назначена внутривенная инфузия интерлейкина-2 в дозе 1 млн МЕ, разведенного на 200 мл физиологического раствора, через день, № 5.

Неврологический статус после проведения курса терапии

В сознании. Ориентирована правильно. Гемипарезов нет. Зрачки симметричные, среднего диаметра. Фотореакции сохранены. Уменьшилось сходящееся косоглазие. Не доводит левый глаз кнаружи. Уменьшилась диплопия по горизонтали. Чувствительность на лице сохранена. Лицо симметричное. Глотание, фонация восстановились. Язычок расположен по средней линии, поднимается при фонации. Язык по средней линии. Симптомов орального автоматизма нет. Снижение мышечной силы в сгибателях предплечья и кисти, в межкостных мышцах до уступчивости с обеих сторон; до 2–3 баллов в проксимальных отделах и до уступчивости в дистальных отделах нижних конечностей. Мышечный тонус в конечностях умеренно повышен по пирамидному типу, больше в ногах, в разгибателях голени и сгибателях стопы с двух сторон. Глубокие рефлексы на руках симметрично повышены. Коленные и ахилловы оживлены до клонуса стоп, ярче справа. Патологические симптомы Россолимо-Вендеровича, Бабинского, Чеддока с обеих сторон. Брюшные рефлексы не вызываются с обеих сторон. Расстройство поверхностной чувствительности в виде проводниковой парагипестезии с уровня D2. Снижение вибрационной чувствительности в руках до 3–4 с., до анестезии в ногах. Координаторные пробы выполняет верхними конечностями с легкой атаксией, в ногах с умеренной интенцией и мимопаданием.

В позе Ромберга пошатывается. С постоянной двухсторонней поддержкой может пройти без отдыха до туалета (около 20 м).

Сохраняются нарушения функции тазовых органов по типу задержки мочи и стула.

Оценка по расширенной шкале инвалидизации Курцке (EDSS) — 6,5.

Больная была повторно пропунктирована: ликвор прозрачный, бесцветный, белок 0,17%, цитоз 83/3 за счет лимфоцитов.

Таким образом, на фоне проводимой терапии отмечалась положительная динамика в виде появления движений в ногах, возможности самостоятельного передвижения, улучшения показателей анализа ликвора. Пациентка была выписана с улучшением. В процессе лечения не было побочных эффектов.

Больная была осмотрена через 2 месяца после выписки — наблюдалось восстановление силы в ногах до уступчивости, регрессирование координаторных расстройств. Пациентка могла свободно передвигаться без поддержки и отдыха на расстояние более 500 метров. Оценка по расширенной шкале инвалидизации Курцке (EDSS) — 4,0 балла.

Больная осмотрена спустя год после госпитализации — неврологический статус прежний. Обострений не отмечала.

Кроме рассеянного склероза препарат интерлейкина-2 (ронколейкин) с эффектом применяется при различных инфекционных заболеваниях, в том числе при ВИЧ-инфекции, хроническом гепатите С, сепсисе, онкологических заболеваниях, при обострениях бронхиальной астмы и atopическом дерматите [2–4, 6, 9].

Эффективность его при заболеваниях, связанных с иммуносупрессией, объясняют необходимостью стимулировать клеточный и гуморальный иммунный ответ [10].

Сложнее объяснить механизмы действия препарата при иммуноаллергических заболеваниях.

Так, при обострениях бронхиальной астмы, atopическом дерматите механизмы лечебного действия могут быть связаны с восстановлением угнетенной функциональной активности Th1 лимфоцитов и, тем самым, с уменьшением синтеза Ig E, с увеличением количества глюкокортикостероидных рецепторов на клетках в периферической крови [6, 7].

Еще более трудным оказывается объяснение эффектов интерлейкина-2 при обострении рассеянного склероза, когда наблюдаются воспалительные реакции на фоне срыва механизмов аутоотолерантности, опосредованных воздействием вирусных агентов, токсических и алиментарных факторов [10].

Можно связать эффективность препарата при обострении рассеянного склероза со следующими механизмами.

Интерлейкин-2 активирует два типа противовирусных ответов — быстрый и медленный. Быстрый тип реализуется через натуральные киллерные клетки и цитотоксические лимфоциты. Спустя 2–4 часа после введения эндогенного интерлейкина-2 наступает активи-

вация натуральных киллерных клеток. Еще через 4 часа запускается работа цитотоксических лимфоцитов, которые разрушают вирус и/или зараженную им клетку. Медленный тип опосредуется, в первую очередь, клеточным механизмом, а затем гуморальным. Примерно на 5 день активированные интерлейкином-2 Тх1 вырабатывают цитотоксические лимфоциты. Через 7 дней под влиянием интерлейкина-2 вырабатываются иммуноглобулины, которые также способствуют инактивации вирусов.

Не исключено воздействие ронколейкина на обострение РС как противовоспалительного препарата. Интерлейкин-2, обладающий широким спектром действий на клетки, не всегда играет роль модулятора воспалительных реакций. В некоторых ситуациях может выступать как противовоспалительный и противоаллергический цитокин. Так, известна способность интерлейкина-2 повышать количество глюкокортикоидных рецепторов на мононуклеарах периферической крови человека, тем самым привлекая эндогенные кортикостероиды в очаги воспаления и способствуя стиханию обострения. Кроме этого, интерлейкин-2 может блокировать выброс гистамина тучными клетками, тормозить выброс токсинов эозинофилами [6, 7].

Интерлейкин-2 и его рекомбинантные препараты обладают способностью активировать процессы репарации и регенерации тканей. В том числе процессы миелообразования за счет активации олигодендроцитов и стимуляции синтеза миелина. Кроме того, описан ноотропный эффект интерлейкина-2 [12].

Известно, что в патогенезе РС существенную роль играет «сшибка» работы центральных органов иммунорегуляции. Возможный эффект интерлейкина-2 заключается в регуляции работы тимуса и костного мозга. С одной стороны, увеличивается и активируется число лимфоцитов, выступающих против чужеродных агентов, собственно измененных клеток, с другой, происходит уничтожение клонов аутоагрессивных клеток.

Возможный эффект эндогенного интерлейкина-2 в период обострения связан с дефицитом этого цитокина, с последующим снижением его содержания по мере стихания процесса. Закономерным кажется и повышение восприимчивости к экзогенному интерлейкину-2 в период эксацербации [14].

Известно, что в стадии обострения рассеянного склероза у большинства больных имеется супрессия общего количества Т-лимфоцитов и Т-хелперов, снижение хелперно-супрессорного коэффициента. Один из основных эффектов интерлейкина-2 связан как раз с нормализацией этих показателей [4], что является еще одной предпосылкой для применения этого цитокина при РС.

Таким образом, данные теоретические механизмы в некоторой степени объясняют полученные клинические результаты, что с одной стороны позволяет использовать

этот препарат и в дальнейшем, с другой — предоставляет возможность для дальнейшего исследования.

Литература

1. Барбас И. М., Скоромец А. А. Рассеянный склероз. Опыт лечения и профилактика обострений. — Санкт-Петербург, 2003: СОТИС. — 124 с.
2. Волкова Е. В., Мешкова Р. Я. Монотерапия Ронколейкином больных atopическим дерматитом // Цитокины и воспаление, 2002: том 1, № 2, с. 33.
3. Журкин А. Т., Фирсов С. Л., Хомченко И. В., Маркова М. В. Эффективность терапии и влияние интерлейкина-2 (Ронколейкина) на иммунологические показатели больных хроническим гепатитом С // Матер. симпозиума: Ронколейкин — рекомбинантный интерлейкин-2 человека. Терапия вторичных иммунодефицитных состояний / Дни иммунологии в Санкт-Петербурге, 2000. — СПб., 2000. — С. 18–22.
4. Козлов В. К., Лебедев М. Ф., Егорова В. Н. Коррекция дисфункций иммунной системы Ронколейкином // Terra Medica, 2001, № 2: 12–14.
5. Мясникова А. Н., Смирнов М. Н., Авот А. Я., Грен Э. Я., Романчиков Н. В., Циманис А. Ю. Рекомбинантная плазмидная ДНК рjDB(MSIL), обеспечивающая синтез интерлейкина-2 человека в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, способ ее получения и штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* — продуцент интерлейкина-2 человека. Патент SU N 1770359. Дата приоритета 24.03.92.
6. Перадзе А. Т., Шапорова Н. Л., Трофимов В. И., Галкина О. В., Калюгин А. П., Смирнов М. Н., Тотолян А. А. Клиническое применение Ронколейкина в терапии больных бронхиальной астмой // Terra Medica, 2002, 2: 7–9.
7. Попович А. М., Егорова В. Н. Ронколейкин. Результаты клинических испытаний // Санкт-Петербург, «Альтернативная Полиграфия», 2004, с. 2–8, 15–18.
8. Смирнов М. Н. Новое поколение иммуномодуляторов. Ронколейкин — интерлейкин-2 человеческий рекомбинантный дрожжевой. — СПб., 1998, 45 с.
9. Смирнов М. Н., Егорова В. Н. Ронколейкин — эффективный иммуномодулятор для лечения иммунодефицитов различной этиологии // Тезисы докладов III Российского национального конгресса «Человек и лекарство». — М., 1996. — 294 с.
10. Томпсон А. Дж., Полман К., Холфельд Р. Рассеянный склероз: клинические аспекты и спорные вопросы / Пер. с англ. Тотолян А. А.; под редакцией Скоромца А. А. — СПб.: Политехника, 2001. — 422 с.
11. Balkwill F. R. Cytokine Cell Biology: A Practical Approach, 3rd edition, Oxford University Press, 2001, p. 35–39.
12. Benveniste E. N., Merill J. E. Stimulation of oligodendroglial proliferation and maturation by interleukin-2 // Nature, 1986, 321; p. 610–613.
13. Meuer S. C., Hussey R. E., Penta S. C. et al. Cellular origin of interleukin-2 (IL-2) in man: evidence for stimulus-restricted IL-2 production by T4+ and T8+ lymphocytes // J. Immunol., 1982, 129; p. 1076–1079.
14. Mussette P., Benveniste O., Lim A. et al. The pattern of production of cytokine mRNAs is markedly altered at the onset of multiple sclerosis // Res. Immunol., 1996, 147, 7; p. 435–441.
15. Robb R. J. Interleukin-2: the molecule and its function // Immunol. Today, 1984: vol. 326, p. 203.

ТИПОВЫЕ ФОРМЫ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ

Н. Н. ПЕТРИШЕВ, Л. В. ВАСИНА, Т. Д. ВЛАСОВ, Н. А. ГАВРИШЕВА, М. А. МЕНШУТИНА
Кафедра патофизиологии ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Росздрава

Резюме. В статье обсуждаются основные патофизиологические механизмы эндотелиальной дисфункции и влияние на ее развитие различных факторов. На основании ведущих патогенетических механизмов выделены четыре типовые формы эндотелиальной дисфункции: вазомоторная с преимущественным нарушением образования оксида азота, простациклина, EDHF, эндотелина-1 и других вазоактивных веществ; гемостатическая с преобладанием изменений образования тромбогенных и атромбогенных эндотелиальных факторов, адгезионная, связанная с гипер- или гипоекспрессией эндотелиальных молекул адгезии, и ангиогенная, связанная с избыточным образованием ангиогенных факторов и возможным изменением чувствительности эндотелия к ангиогенным факторам. С учетом появления в последние годы лекарственных препаратов, влияющих на состояние эндотелия при его дисфункции приведены основные группы препаратов и механизмы их фармакологического действия.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, патогенетические механизмы, фармакологическая коррекция.

TYPICAL FORMS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

N. N. PETRISHCHEV, L. V. VASINA, T. D. VLASOV, N. A. GAVRISHEVA, M. A. MENSHTUTINA
State Educational Institution of Higher Professional Education «Saint-Petersburg I. P. Pavlov State Medical University», Federal Agency for Health Care and Social Development, department of pathophysiology

Summary. The article concerns the main pathophysiological mechanisms of endothelial dysfunction and influence of different factors on its development. Basing on the main pathogenetic mechanisms 4 typical forms of dysfunction are discussed — vasomotor with dominating nitric oxide, prostacycline, EDHF, endothelin-1 and other vasoactive substances, hemostatic with dominating changes in thrombogenous and atrombogenous endothelial factors synthesis, adhesion-related with hyper or hypoeexpression of endothelial adhesion molecules and angiogenous related with excessive synthesis of angiogenous factors and possible changes of endothelial sensitivity to angiogenous factors. Taking into consideration appearance of drugs influencing endothelial dysfunction main drug groups and mechanisms of their pharmacological effect are given.

Key words: endothelial dysfunction, pathogenetic mechanisms, pharmaceutical correction.

Дисфункция эндотелия является одним из универсальных механизмов развития многих патологических процессов и заболеваний, в том числе таких распространенных, как атеросклероз, гипертоническая болезнь, сахарный диабет. Дисфункция эндотелия играет важную роль в развитии тромбоза, неоангиогенеза, ремоделирования сосудов, внутрисосудистой активации тромбоцитов и лейкоцитов, увеличении проницаемости сосудов и т. д. [11, 13, 15].

Преимущественное нарушение той или иной функции эндотелия зависит от локализации патологического процесса, наличия гемодинамических сдвигов, преобладания тех или иных гуморальных факторов, повреждающих эндотелий. Среди причин эндотелиальной дисфункции наибольшее значение имеют:

- гемодинамические факторы (пристеночное напряжение сдвига, трансмуральное давление, деформация, связанная с пульсацией),
- дислипотеинемия (гиперхолестеринемия),
- гиперцитокинемия,
- гипергомоцистеинемия,
- гипергликемия,
- свободнорадикальное повреждение эндотелия,

- генетические дефекты,
- возрастные изменения,
- эндогенные интоксикации и экзогенные интоксикации.

В широком смысле эндотелиальная дисфункция может быть определена как:

- 1) неадекватное (уменьшение или увеличение) образование эндотелиальных факторов; 2) образование конформационно измененных эндотелиальных факторов; 3) нерегулируемое образование эндотелиальных факторов.

В последнее время сложилось более узкое представление об эндотелиальной дисфункции как о состоянии эндотелия, при котором имеется недостаточная продукция оксида азота. Поскольку оксид азота принимает участие в регуляции практически всех функций эндотелия (регуляция сосудистого тонуса, тромборезистентность сосудов, регуляция адгезии лейкоцитов и проницаемости сосудов), а кроме того, является фактором, наиболее чувствительным к повреждению, такое представление о дисфункции эндотелия достаточно корректно, хотя и не является полным. Важнейшим фактором нарушения образования и/или биодоступности оксида

азота является избыточное образование активных форм кислорода, что наблюдается при многих заболеваниях.

Кроме понятия «дисфункция эндотелия» необходимо выделить также понятие «стимуляция эндотелия» (при которой под действием различных факторов происходит увеличение активности eNOS, циклооксигеназы-1 и других ферментов эндотелиоцитов с увеличением образования оксида азота, простациклина и других БАВ, а также высвобождение накопленных в эндотелиоцитах факторов), а также активацию эндотелия, сопровождающуюся экспрессией генов и активацией синтетических процессов в эндотелиоцитах.

В клинической практике функциональную активность эндотелия оценивают преимущественно с помощью инструментальных методов. Для этого исследуют эндотелий-зависимую вазодилатацию при фармакологических пробах (например, с ацетилхолином), пробе с реактивной гиперемией (по изменению напряжения сдвига при прекращении/восстановлении кровотока по плечевой артерии), пробе с холодовым или ментальным стрессом (при исследовании кровотока в миокарде), и некоторых других.

Другим методом оценки выраженности эндотелиальной дисфункции является лабораторная диагностика — оценка содержания в крови различных веществ, образующихся в эндотелии (см. таблицу 1). В настоящее время существуют методики определения в крови практически всех известных веществ, образующихся в эндотелии, однако не все показатели имеют одинаковую диагностическую ценность, поскольку значительная часть маркеров эндотелиальной дисфункции образуется не только в эндотелии, но и в других клетках.

По скорости образования в эндотелии различных факторов (что связано во многом и с их структурой), а также по преимущественному направлению секреции этих веществ (внутриклеточная или внеклеточная) их можно разделить на следующие группы.

1. *Факторы, постоянно образующиеся в эндотелии* и выделяющиеся из клеток в базолатеральном направлении или в кровь, например NO, простациклин. Скорость образования этих факторов связана с быстро меняющимися условиями регуляции, в частности, с изменением напряжения сдвига или действием вазоактивных веществ, цитокинов. Почти любое повреждение эндотелия сопровождается либо нарушением синтеза, или биодоступности этой группы веществ. В то же время, при этом в эндотелии образуются индуцируемые синтаза оксида азота и циклооксигеназа-2, что приводит к значительному повышению выработки NO и простациклина.
2. *Факторы, накапливающиеся в эндотелии* и выделяющиеся из него при стимуляции (фактор Виллебранда, Р-селектин, тканевой активатор плазминогена). При действии катехоламинов, гистамина, тромбина, активированных фрагментов системы комплемента, цитокинов, вазопрессина и др. проис-

Таблица 1

Маркеры эндотелия, изменение концентрации которых в крови является признаком эндотелиальной дисфункции

Показатель	Степень специфичности
Десквамированные эндотелиальные клетки	Очень высокая
Е-селектин	Очень высокая
sICAM-1	Очень высокая
sVCAM-1	Очень высокая
Тромбомодулин	Очень высокая
Рецепторы к протеину С	Очень высокая
Аннексин-II	Очень высокая
Простациклин	Очень высокая
Микрочастицы плазматической мембраны клеток	Высокая
Тканевой активатор плазминогена t-РА	Высокая
Р-селектин	Высокая
Аннексин-V	Высокая
Фактор Виллебранда (ФВ)	Высокая
Ингибитор тканевого фактора (TFPI)	Высокая
Протеин S	Высокая
Оксид азота (NO)	Высокая
Ингибитор активатора плазминогена 1 (РАI-1)	Средняя
Нитриты и нитраты	Средняя
Тканевой фактор (TF)	Средняя
VEGF	Средняя
u-РА	Средняя
Ангиотензин-II	Средняя
Экто-АДФаза	Низкая

- ходит высвобождение фактора Виллебранда и t-РА в кровь, и перемещение на мембрану эндотелиоцита Р-селектина с незначительным поступлением его в кровь (растворенный Р-селектин). Эти факторы могут попадать в кровь не только при стимуляции эндотелия, но и при его активации и повреждении.
3. *Факторы, синтез которых в нормальных условиях практически не происходит, однако резко увеличивается при активации эндотелия* (эндотелин-1, ICAM-1, VCAM-1, Е-селектин, РАI-1). Эти факторы либо экспрессируются на эндотелиоцитах (ICAM-1, VCAM-1, Е-селектин) и частично выделяются в кровь (растворимые ICAM-1, VCAM-1, Е-селектин), либо секретируются (эндотелин-1, РАI-1).

4. *Факторы, являющиеся внутриклеточными белками* (тканевой фактор, аннексин-V) *либо являющиеся мембранными рецепторами эндотелия* (тромбомодулин, рецептор протеина C). Высвобождение этих факторов в кровь наблюдается при повреждении эндотелия и апоптозе.

Косвенным методом оценки состояния функционального состояния эндотелия является исследование содержания в крови факторов, повреждающих эндотелий, уровень которых коррелирует с эндотелиальной дисфункцией. К таким факторам (медиаторам повреждения эндотелия) относятся: гиперхолестеринемия (уровень ЛПНП, ЛПОНП), С-реактивный белок, антифосфолипидные антитела, ангиотензин-II, гипергомоцистеинемия, асимметричный диметиларгинин (ADMA), липопротеин (а), ксантиноксидаза, цитокины (ИЛ-1 β , α -ФНО, ИЛ-8 и др.).

Можно выделить несколько вариантов изменения функциональной активности эндотелия:

- дисфункция эндотелия (уменьшение синтеза факторов первой группы, синтез конформационно измененных эндотелиальных факторов, или нерегулируемый синтез эндотелиальных факторов);
- стимуляция эндотелия (повышение содержания в крови факторов второй группы);
- активация эндотелия (повышение содержания в крови факторов 1–3 групп);

Как правило, в конкретной клинической ситуации могут сочетаться несколько вариантов изменения функциональной активности эндотелия, поэтому в крови происходит изменение содержания различных факторов. Поскольку проявления дисфункции эндотелия при различных заболеваниях отличаются, как и степень нарушения образования отдельных эндотелиальных факторов, целесообразно выделить следующие типовые формы дисфункции эндотелия:

- **вазомоторная:** нарушение образования оксида азота, простациклина, EDHF, эндотелина-1 и других вазоактивных веществ;
- **гемостатическая:** изменение образования тромбогенных и атромбогенных эндотелиальных факторов;
- **адгезионная:** гипер- или гипоэкспрессия эндотелиальных молекул адгезии;
- **ангиогенная:** избыточное образование ангиогенных факторов, возможно, изменение чувствительности эндотелия к ангиогенным факторам.

Вазомоторная форма дисфункции эндотелия.

Эндотелий-зависимая вазодилатация в основном связана с синтезом в эндотелии оксида азота, эндотелиального гиперполяризующего фактора (EDHF) и простациклина. Другие вазодилататоры, образующиеся в эндотелии, в том числе адреномедулин, анандамид, натрийуретический пептид С, по-видимому, имеют меньшее значение

в регуляции сосудистого тонуса. Кроме эндотелий-зависимой вазодилатации, выделяют также и механизмы эндотелий-зависимой вазоконстрикции, связанные с синтезом в эндотелии тромбоксана А₂, 20-НЕТЕ (20-гидроксиэйкозотетраеновая кислота), эндотелина-1, ангиотензина II. Согласно принципу антагонистической регуляции, образование вазоконстрикторных веществ происходит, как правило, при стимуляции выработки вазодилататоров. Результирующий эффект (сосудосуживающий или сосудорасширяющий) вазоактивных веществ находится в зависимости от их концентрации, а также от типа и локализации сосудов, что объясняется неравномерным распределением рецепторов в артериях; артериолах, венах, венах и даже в одинаковых сосудах в разных регионах. Нарушение соотношения между эндотелиальными вазоконстрикторами и вазодилататорами имеет значение в механизме как системного повышения артериального давления, так и локального ангиоспазма. Использование селективных функциональных проб (с ацетилхолином, нитроглицерином, ингибиторами NO-синтазы, циклооксигеназы и т. д.) позволило нам выявить ряд особенностей изменений реактивности сосудов при атеросклерозе и окклюзионных заболеваниях сосудов нижних конечностей [2], болезни Рейно [4], хронических заболеваниях почек [6, 7, 17, 18, 19], бронхиальной астме [9], при гестозах [10].

Гемостатическая форма дисфункции эндотелия.

Среди веществ, образующихся в эндотелии и участвующих в гемостазе или влияющих на этот процесс, можно выделить две группы — тромбогенные и атромбогенные факторы. К тромбогенным факторам, индуцирующим адгезию и агрегацию тромбоцитов, тромбогенез, угнетающим фибринолиз, относятся фактор Виллебранда, фактор активации тромбоцитов, аденозиндифосфорная кислота, тромбоксан А₂, тканевой фактор, ингибиторы тканевого активатора плазминогена. Уровень продукции этих факторов определяет тромбогенный потенциал сосудов. К атромбогенным веществам относятся оксид азота, простациклин, экто-АДФазы, ингибитор внешнего пути свертывания крови, тромбомодулин, протеогликаны, тканевой активатор плазминогена и некоторые другие, которые тормозят процессы адгезии и агрегации тромбоцитов, тромбогенез, активируют фибринолиз и тем самым определяют тромборезистентность. В физиологических условиях образование атромбогенных веществ в эндотелии преобладает над образованием тромбогенных; это обеспечивает сохранение жидкого состояния крови при повреждениях сосудистой стенки, в том числе незначительных, случайных, которые могут иметь место в норме [11, 14].

Снижение тромборезистентности сосудов, сопровождающееся сосудистой тромбофилией, — одно из проявлений дисфункции эндотелия. Результаты наших экспериментальных и проведенных совместно с клиницистами исследований свидетельствуют о том, что при ряде патологических процессов и заболеваний, отлича-

ющихся по этиологии и механизмам развития, наряду с общей направленностью изменения содержания в крови эндотелиальных тромбoreгуляторов имеются особенности, характерные для определенных заболеваний и коррелирующие с гемодинамическими нарушениями, дислипидемией, увеличением провоспалительных цитокинов и т. д. Наиболее значительные изменения тромбoreзистентности сосудов наблюдаются при опухолевом росте, ишемии-реперфузии, остром инфаркте миокарда [3, 12, 13, 23].

Тромбогенные свойства эндотелия тесно связаны с апоптозом. Одним из наиболее ранних признаков апоптоза является экспозиция на клеточной мембране фосфатидилсерина. Перемещение фосфатидилсерина происходит при участии специальной транслоказы. Этот процесс является неотъемлемой частью апоптоза, независимо от типа клеток и пускового механизма активации программы гибели клеток.

На поверхности апоптотических клеток при участии фосфатидилсерина активируются прокоагулянтные реакции: образование протромбиназного комплекса и тромбиногенез. В крови идентифицированы микрочастицы плазматической мембраны эндотелия, на поверхности которых экспрессирован фосфатидилсерин. В норме их количество невелико, но значительно вырастает при остром коронарном синдроме, тромбоцитопенической пурпуре, рассеянном склерозе, сепсисе и ряде других заболеваний. Эти микрочастицы рассматриваются как маркеры стимуляции и повреждения эндотелия, а также апоптоза. В физиологических условиях их появление, возможно, связано с репаративными процессами. Микрочастицы поддерживают генерацию малых количеств тромбина, который активирует протенин С (антикоагулянтная функция). При большом поступлении микрочастиц плазматической мембраны эндотелия (и тромбоцитов) увеличивается прокоагулянтная активность крови за счет экспрессии на их поверхности фосфатидилсерина. Этот механизм играет важную роль в патогенезе тромбофилии при атеросклерозе.

Таким образом, апоптотические клетки, в том числе эндотелиоциты и гладкомышечные клетки сосудов, обладают значительной прокоагулянтной активностью. Аннексин А5 (возможно, и другие аннексины) связывается с фосфатидилсерином, формирует «антитромботический щит» и снижает риск тромбоза, связанного с апоптозом. Уровень аннексина А5 и антител к нему значительно повышен при остром коронарном синдроме, особенно при инфаркте миокарда [16].

Адгезионная форма дисфункции эндотелия. Взаимодействие лейкоцитов и эндотелия — физиологический, постоянно протекающий процесс, осуществляющийся при участии специальных адгезивных молекул. На луминальной поверхности эндотелиоцитов представлены Р- и Е-селектины, межклеточные и сосудистые клеточные молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM-1). Экспрессия молекул адгезии происходит под влиянием

медиаторов воспаления, противовоспалительных цитокинов, окисленных ЛПНП, тромбина и других стимулов. При участии Р- и Е-селектинов осуществляется задержка и неполная остановка лейкоцитов (роллинг), а ICAM-1, VCAM-1, взаимодействуя с соответствующими лигандами лейкоцитов, обеспечивают полную остановку (адгезию) лейкоцитов. Повышение адгезивности эндотелия и неконтролируемая адгезия лейкоцитов имеют большое значение в патогенезе ишемического-реперфузионного повреждения, воспаления, септического шока, респираторного дистресс-синдрома, атеросклероза и других патологических процессах [11, 13].

В экспериментальных исследованиях, выполненных на нашей кафедре, показано, что при опухолевом росте (лимфосаркома Плиса, 1,2-диметилгидразин-индуцированные опухоли толстой кишки у крыс), экспериментальном энцефаломиелите увеличена адгезивность эндотелия венул брыжейки тонкой кишки, сочетающаяся с уменьшением их тромбoreзистентности [8, 12, 21, 22]. У больных ИБС повышено содержание в крови sICAM-1 и sVCAM-1, коррелирующее со степенью выраженности атеросклероза [3, 5].

Ангиогенная форма дисфункции эндотелия. В процессе неоангиогенеза выделяют несколько стадий: увеличение проницаемости эндотелия и разрушение базальной мембраны, миграция эндотелиальных клеток, пролиферация и созревание эндотелиальных клеток, ремоделирование сосудов. Процесс неоангиогенеза является обязательным компонентом процесса заживления ран, воспаления, опухолевого роста, а также имеет место при длительной гипоксии. На различных этапах неоангиогенеза исключительно важную роль играют факторы, образующиеся в эндотелии: сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), ангиопоэтины; кроме того, на поверхности эндотелия имеются рецепторы, с которыми взаимодействуют регуляторы ангиогенеза, образующиеся в других клетках. Нарушение регуляции неоангиогенеза или стимуляция этого процесса вне связи с функциональными потребностями могут привести к тяжелым последствиям (например, пролиферативной ретинопатии при сахарном диабете, неоваскулярной глаукоме, ретиноваскулиту и т. д.) [1].

Как показывает наш опыт, выделение отдельных форм дисфункции эндотелия имеет определенное практическое значение для оптимизации подходов к ее фармакологической коррекции. Не исключено, что различные формы эндотелиальной дисфункции возникают в связи с преимущественным действием различных медиаторов дисфункции эндотелия.

В последние годы широкое применение получили препараты, влияющие на состояние эндотелия при его дисфункции. Кроме того, некоторые группы традиционно используемых препаратов также влияют на эндотелий-зависимые реакции [20]. Можно выделить несколько направлений фармакологической коррекции дисфункции эндотелия:

1) «заместительная» терапия (препараты t-РА, протеин С, нитраты, комплексные препараты [НО-аспирин] и др.);

2) влияние на синтез эндотелиальных факторов (ингибиторы АПФ, антагонисты рецепторов 1 типа АТ-II, β-адреноблокаторы, эстрогены, L-аргинин, тетрагидробиоптерин, нитроаргинин, антагонисты кальциевых каналов, антагонисты эндотелина, Вессел Дуэ Ф и др.);

3) уменьшение связывания эндотелия с прокоагулянтами (гепарин, низкомолекулярные гепарины, Вессел Дуэ Ф и др.);

4) влияние на метаболизм липопротеидов в сосудистой стенке (статины, эстрогены, Вессел Дуэ Ф (сулодексид) и др.);

5) влияние на экспрессию молекул адгезии (L-аргинин, адреноблокаторы и др.);

6) уменьшение действия повреждающих факторов (антиоксиданты, гепарин, низкомолекулярные гепарины, фолиевая кислота, Вессел Дуэ Ф и др.);

7) влияние на апоптоз эндотелиоцитов (статины, антиоксиданты и др.).

Дальнейшее исследование эндотелиальной дисфункции, ее форм и их зависимости от профиля факторов, влияющих на эндотелий, является перспективным направлением в медицине.

Литература

- Астахов Ю. С., Петрищев Н. Н., Тульцева С. Н., Лисочкина А. Б., Шадрин Ф. Е. Тромбоз вен сетчатки (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение). — Санкт-Петербург, СПбГМУ, 2006. — 64 с.
- Васина Е. Ю., Меншутин М. А., Власов Т. Д. Оценка функционального состояния эндотелия у больных облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. — 2004. — Т. XI, № 2. — С. 68–73.
- Васина Л. В. Маркеры апоптоза и дисфункция эндотелия при остром коронарном синдроме // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — № 4(12). — 2004. — С. 5–10.
- Власов Т. Д., Петрищев Н. Н., Меншутин М. А., Васина Е. Ю., Гирина М. Б. Механизмы эндотелиальной дисфункции при болезни Рейно // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2006, прил. — С. 12–13.
- Гавришева Н. А., Алексеева Г. В., Сесь Т. П., Беркович О. А., Панов А. В. Уровень липидов крови, фактора некроза опухолей-α и межклеточной адгезионной молекулы-1 у больных ишемической болезнью сердца // Медицинская иммунология. — 2002. — Т. 4, № 4–5. — С. 609–613.
- Гавришева Н. А., Сесь Т. П., Федулов А. В., Панченко А. В. Трансформирующий ростовой фактор-β1 и фактор некроза опухолей-α как медиаторы дисфункции эндотелия при экспериментальной хронической почечной недостаточности // Медицинский академический журнал. — 2003. — Т. 3, № 3, приложение 4. — С. 63–64.
- Гавришева Н. А., Малинин В. В., Сесь Т. П., Козлов К. Л., Панченко А. В., Титков А. Ю. Эффект пептида Вилон на уровень трансформирующего фактора-β1 и проницаемость микрососудов при экспериментальной почечной недостаточности // Бюлл. эксп. биол. и медицины, 2005. Т. 139, № 1. — С. 28–31.
- Гавришева Н. А., Абдурасулова И. Н., Трофимов Е. А., Житнухин Ю. Л. Адгезивные свойства эндотелия при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите // Эфферентная терапия, 2005. Т. 11, № 2. — С. 18–22.
- Меншутин М. А. Нарушения микроциркуляции слизистой дыхательных путей и ремоделирование бронхов при бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. — 2004. — Т. XI, № 3. — С. 30–36.
- Мозговая Е. В., Павлова Н. Г., Хохлов П. П., Сепиашвили Т. И., Печерина Л. В., Петрищев Н. Н. Влияние препарата Вессел Дуэ Ф (сулодексид) на эндотелий и кровообращение в функциональной системе мать—плацента—плод у беременных с сочетанным гестозом // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 37–44.
- Петрищев Н. Н., Власов Т. Д., Дубина М. В. Дисфункция эндотелия — ключевой фактор нарушений микроциркуляции // Вестник Российской военно-медицинской академии, 1999, № 2. — С. 41–42.
- Петрищев Н. Н., Дубина М. В. Дисфункция эндотелия микрососудов как фактор метастазирования // Вопросы онкологии. — 1999. — Т. 45. — № 5. — С. 484–492.
- Петрищев Н. Н., Власов Т. Д. Функциональное состояние эндотелия при ишемии-реперфузии (обзор литературы) // Российский Физиологический Журнал им. И. М. Сеченова, 86 (2), 2000. — С. 148–163.
- Петрищев Н. Н., Михайлова И. А. Лазер-индуцированный тромбоз сосудов. — Санкт-Петербург, СПбГМУ, 2001, 87 с.
- Петрищев Н. Н., Власов Т. Д. Физиология и патофизиология эндотелия // В кн. «Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция» под редакцией Н. Н. Петрищева. — Изд. СПбГМУ, Санкт-Петербург, 2003.
- Петрищев Н. Н., Васина Л. В., Аннексин А5 и дисфункция эндотелия // Ученые записки СПбГМУ имени акад. И. П. Павлова. — Том XI. — № 3. — 2004. — Приложение. — С. 45–47.
- Петрищев Н. Н., Смирнов А. В., Панина И. Ю., Меншутин М. А., Васина Е. Ю., Румянцев А. Ш., Дегтерева О. А., Шевякова Е. В. Предикторы развития атеросклероза у больных хронической болезнью почек // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2004. — Т. 3, № 12. — С. 17–20.
- Петрищев Н. Н., Смирнов А. В., Панина И. Ю., Меншутин М. А., Васина Е. Ю., Румянцев А. Ш., Дегтерева О. А., Шевякова Е. В. Вазомоторная форма дисфункции эндотелия как предвестник атеросклероза при хронической болезни почек // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2005. — Т. 4, № 13. — С. 114–116.
- Петрищев Н. Н., Панина И. Ю., Смирнов А. В., Румянцев А. Ш., Меншутин М. А., Графова М. Н. Динамика вазомоторной дисфункции эндотелия у больных хронической болезнью почек // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2006, прил. — С. 51.
- Шляхто Е. В., Петрищев Н. Н., Беркович О. А., Сергеева Е. Г. Методы коррекции дисфункции эндотелия // В кн. «Атеросклероз, проблемы патогенеза и терапии» под редакцией Климова А. Н., Шляхто Е. В. — Изд. Медицинская литература, Санкт-Петербург, 2006.
- Dubina M. V., Petrishchev N. N., Anisimov V. N. Microvascular endothelium dysfunction in rats bearing 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors // Cancer Lett. 1999 Oct 1; 144(2): 125–9.
- Dubina M. V., Petrishchev N. N., Anisimov V. N. Microvascular endothelium dysfunction during growth of transplanted lymphosarcoma and glioma in rats // J. Exp. Clin. Cancer Res. 1999; 18(4): 537–42.
- Petrishchev N. N., Vlasov T. D. Mesenteric microcirculation and postischemic reperfusion of rat brain // Pathophysiology, 2000, 6(4), P. 271–274.

ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ RGD-ПЕПТИДОВ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО СВЕТОДИОДНОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА АДФ-ИНДУЦИРОВАННУЮ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Ю. Е. МОСКАЛЕНКО*, И. Н. ДЕМЕНТЬЕВА**, М. И. КАДИНСКАЯ**, С. В. БУРОВ*

* Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

** ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Росздрава

Резюме. В статье представлены результаты исследования антиагрегантного действия серии аналогов RGD-пептидов, модифицированных неприродными аминокислотами. Показано, что замена аргинина на структурные аналоги, содержащие гуанидиновую группу, повышает устойчивость препаратов к действию протеолитических ферментов. При этом в ряде случаев получены пептиды, обладающие значительной антиагрегантной активностью. В ходе дальнейших экспериментов установлено наличие синергического действия синтезированных аналогов и низкоинтенсивного светодиодного облучения красного диапазона на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, RGD-пептиды, неприродные аминокислоты, светодиодное облучение.

THE INFLUENCE OF RGD PEPTIDES ANALOGUES AND LOW-POWER LIGHT-EMITTING DIODE IRRADIATION ON ADP-INDUCED PLATELET AGGREGATION

YU. E. MOSKALENKO*, I. N. DEMENTIEVA**, M. I. KADINSKAYA**, S. V. BUROV*

* Institute of macromolecular compounds RAS, St. Petersburg

** State Educational Institution of Higher Professional Education «Saint-Petersburg State I. P. Pavlov Medical University, Federal Agency for Health Care and Social Development»

Summary. The article discusses the results of antiaggregant action of some RGD-peptide analogues, modified by unnatural (artificial) aminoacids. Replacement of arginine by structural analogues containing guanidine group increases the resistance of drugs to proteolytic enzymes action. Some peptides obtained were revealed to have significant antiaggregant activity. Further experimental studies showed the presence of synergetic action on ADP-induced platelet aggregation between the analogues synthesized and low-power red light-emitting diode irradiation.

Key words: platelet aggregation, RGD peptides, unnatural aminoacids, red light-emitting diode irradiation.

Сокращения:

R	—	аргинин,
G	—	глицин,
D	—	аспарагиновая кислота,
АДФ	—	аденозиндифосфат,
Вос	—	трет-бутилоксикарбонил,
Bzl	—	бензил,
F	—	фенилаланин,
ВЭЖХ	—	высокоэффективная жидкостная хроматография

Введение

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, смертность от тромбоэмболических заболеваний в развитых странах занимает первое место [6, 12]. В связи с этим большое значение имеет определение роли тромбоцитов в патогенезе тромботического процесса. Одним из перспективных направлений в этой области является разработка эффективных ингибиторов агрегации тромбоцитов на основе так называемых RGD-пептидов. Эта

последовательность содержится в адгезивных белках крови, таких как фибриноген, фактор фон Виллебранда, витронектин, фибронектин и ламинин [14, 15]. Ее распознавание гликопротеиновыми рецепторами GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ -интегринами) играет ключевую роль в процессе агрегации тромбоцитов [17]. Поэтому RGD-пептиды препятствуют взаимодействию фибриногена с соответствующими рецепторами, т. е. проявляют антиагрегантный эффект по конкурентному механизму. Вместе с тем основным недостатком рассматриваемых соединений является короткое время полужизни в кровяном русле вследствие нестабильности связи аргинин-глицин к действию ряда ферментов (трипсина, тромбина и фактора коагуляции Ха). Поэтому актуальным направлением исследований является поиск высокоэффективных ингибиторов агрегации тромбоцитов, обладающих высокой стабильностью к энзиматическому расщеплению [18].

В последние годы для коррекции измененного гемостаза наряду с традиционными все больше применяются немедикаментозные методы лечения. Неинвазивные варианты светолечения (облучение кожных покровов)

наряду с инвазивными (внутрисосудистое и экстракорпоральное облучение крови пациентов лазерным светом) ведут к развитию комплекса позитивных терапевтических эффектов. В клинике внутренних болезней для лечения больных кардиологического профиля, в том числе с клиническими проявлениями атеросклероза, применяют лазерное излучение в красной и ближней инфракрасной области спектра. Наиболее простым и доступным является внутрисосудистый метод фототерапии, при этом облучению подвергается определенный объем циркулирующей крови. Ширина лечебного действия красного света обусловлена улучшением реологических свойств крови, снижением агрегационной активности тромбоцитов, улучшением циркуляции крови в микрососудах и стимуляцией иммунитета [1, 5, 6, 11]. Вместе с тем в литературе отсутствуют подробные данные относительно механизма терапевтического действия светового облучения.

В наших предыдущих работах [4, 8] показано, что низкоинтенсивное лазерное излучение и светодиодное узкополосное некогерентное излучение оказывают одностороннее воздействие на функциональную активность тромбоцитов, проявляющееся в ингибировании агрегации. Уменьшение агрегационной активности кровяных пластинок отмечалось и в клинической практике после внутрисосудистой фотомодификации крови лазерным и светодиодным излучением красного диапазона [2, 7]. Лазерные технологии широко применяют как в качестве самостоятельных методов терапии, так и в сочетании с приемом внутрь лекарственных препаратов. Использование гелий-неонового лазерного излучения в сочетании с лекарственной терапией при различных формах ишемической болезни сердца является эффективным методом лечения [8]. Вместе с тем необходимо учитывать, что на фоне облучения могут изменяться терапевтические свойства различных фармакологических средств (как в сторону повышения, так и уменьшения эффективности действия). В литературе недостаточно освещен вопрос комплексной оценки фотомодификации крови светодиодом красного диапазона при сочетанном применении антиагрегантов.

Целью данной работы является исследование влияния новых аналогов RGD-пептидов на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека в комплексе с низкоинтенсивным светодиодным облучением красного диапазона.

Материалы и методы исследования

В работе использовали реактивы для пептидного синтеза и производные аминокислот фирм Sigma Chemical Co., Fisher Scientific, Bachem (США), 4-(гидроксиметил)фенилацетамидометил-полимер (Neosystem Laboratoires, Франция), полимер Меррифилда (Novabiochem, Швейцария; IRIS Biotech, Германия). Пептиды синтезировали твердофазным методом при использовании Boc/OBzl-стратегии в ручном варианте

или на полуавтоматическом пептидном синтезаторе NPS-4000 (Neosystem Laboratoires, Франция). Очистку полученных продуктов осуществляли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе System Gold (Beckman, США). Аминокислотный анализ проводили на анализаторе «Microtechna» ТЗЗ9М (Чехия) после гидролиза пептидов 6 н. HCl при 110° С в течение 24 ч. Масс-спектры регистрировали на времяпролетном масс-рефлектроне МХ-5303 с источником ионов типа «Электроспрей» (Филиал Института энергетических проблем химической физики (ФИНЭПХФ) РАН). Для оценки агрегационной активности тромбоцитов по методу Борна использовали анализатор агрегации тромбоцитов AP2110 («Солар», республика Беларусь). Агрегацию тромбоцитов индуцировали АДФ («Технология Стандарт», Барнаул). В качестве источника светодиодного облучения использовали облучатель светодиодный физиотерапевтический узкополосный ОСТУ-01 «Рубин-МЦ» («Медлаз-Нева», Санкт-Петербург).

Пептидный синтез

Твердофазный синтез пептидов проводили при наращивании аминокислотной последовательности с помощью *N,N'*-диизопропилкарбодиимидом в присутствии 6-хлор-1-гидроксibenзотриазола. По окончании синтеза пептиды отщепляли от полимерного носителя с одновременным деблокированием с помощью 1М раствора трифторметансульфокислоты в трифторуксусной кислоте в присутствии тиоанизола и этандитиола. После деблокирования пептиды обессоливали на колонке с биогелем Р-2 в 0,1 М растворе бикарбоната аммония. Для дальнейшей очистки применяли обращенно-фазовую ВЭЖХ. Полученные соединения охарактеризованы с помощью аналитической ВЭЖХ, масс-спектрометрии и аминокислотного анализа.

Получение донорской плазмы

Все доноры в течение 10–12 дней до момента отбора крови не получали препаратов, влияющих на функциональную активность тромбоцитов. Забор крови для исследования производился натощак в утренние часы из локтевой вены 3-х здоровых доноров. Кровь стабилизировалась 3,8% раствором цитрата натрия в объемном соотношении 9:1. Для исключения контактной активации тромбоцитов в работе использовали только пластмассовую посуду (куветы, пробирки). Богатую тромбоцитами плазму получали центрифугированием при 100 g в течение 10 минут. Бедную тромбоцитами плазму получали центрифугированием в течение 15 минут при 2000 g.

Исследование антиагрегантной активности RGD-аналогов

Анализ функциональной активности тромбоцитов осуществлялся не ранее чем через 20 минут, и не позднее

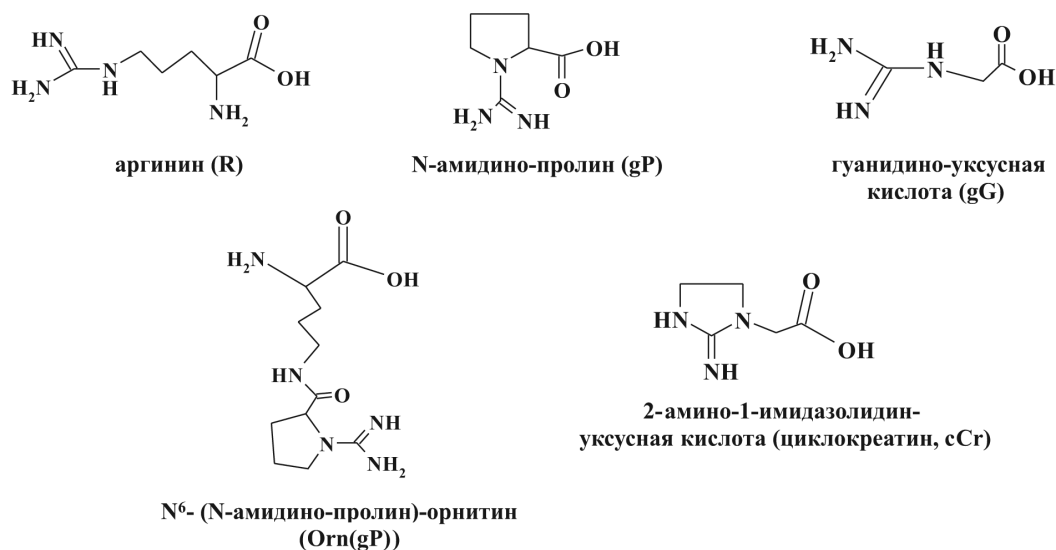


Рис. 1. Структуры N-концевых аминокислот

чем через 2 часа после получения крови. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали АДФ в конечной концентрации 2,5 мкМ. Все исследуемые пептиды растворяли в физиологическом растворе (рН 7,35) в концентрациях (0,017±0,17) моль/л и вводили в богатую тромбоцитами плазму, находящуюся в кювете агрегометра. Препарат cCr-GDF растворяли в фосфатном буфере (рН 8). Время предварительной инкубации препаратов с плазмой при 37° С составляло 3 минуты при постоянном перемешивании со скоростью 600 об/мин. Обработка агрегатограмм производилась по общепринятым характерным точкам кривых агрегации с определением максимальной амплитуды процесса к 5-й минуте от момента ввода стимулятора. Количественно влияние препаратов на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека оценивалось по отношению к контрольной пробе. Определялось значение IC₅₀, соответствующее 50% ингибирования максимальной степени агрегации по отношению к контролю. Обработка экспериментальной зависимости логарифма

концентрации препарата (по оси X) и отношения опытного значения агрегации тромбоцитов к контрольному в % (по оси Y) проводилась методом нелинейной регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5.

Светодиодное облучение плазмы

В кювету помещали плазму с расчетной концентрацией пептидов и в темноте осуществляли облучение светодиодом с красной излучающей головкой (630 нм, максимальная мощность излучения 18 мВт). Экспозиция облучаемой плазмы объемом 0,8 см³ составила 10 минут, плотность мощности 7,2 мВт/см², доза облучения 4,32 Дж/см².

Результаты и обсуждение

В качестве объектов исследования были выбраны аналоги фрагмента (95–98) α-цепи фибриногена (последовательность RGDF) [13], который имеет достаточно простую структуру и высокую антиагрегантную активность. При этом для повышения стабильности препарата к ферментативному расщеплению и сохранения эффективности действия N-концевой остаток аргинина заменяли близкими по структуре неприродными аминокислотами, содержащими гуанидиновую группу (рис. 1).

Устойчивость препаратов к действию ферментов плазмы крови человека была изучена на примере аналога с N-амидино-пролином [3]. По данным обращенно-фазовой ВЭЖХ, содержание пептида (2) в плазме остается практически неизменным в течение часа, в то время как природная последовательность RGDF расщепляется полностью (рис. 2).

На следующем этапе работы была исследована биологическая активность синтезированных аналогов *in vitro* в условиях АДФ-индуцированной агрегации тром-

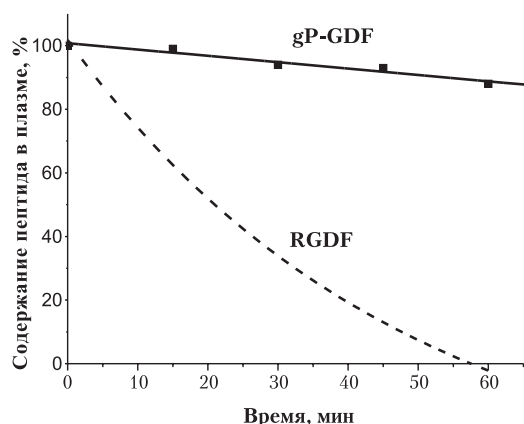


Рис. 2. Стабильность аналога (2) в плазме крови человека

Таблица 1

Исследование влияния RGD-пептидов на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека

№ п/п	Препарат	Содержание вещества*, %	MW	IC ₅₀	
				10 ⁻³ моль/л (доверительный интервал, P = 95%)	мкг/мл
1	R-GDF	58	493,21	2,0 · 10 ⁻² (1,7 · 10 ⁻² ; 2,5 · 10 ⁻²)	10 (лит. 17 [16])
2	gP-GDF	64	476,20	1,09 (0,87; 1,34)	518
3	gG-GDF	78	436,13	1,93 (1,78; 2,09)	842
4	gP-GGDF	61	533,23	2,93 (2,38; 3,61)	1563
5	Orn(gP)-GDF	62	590,28	2,56 (1,03; 6,54)	1534
6	cCr-GDF	65	462,26	0,85 (0,40; 1,80)	392
7	cCr-RGDF	70	618,45	4,38 · 10 ⁻³ (6,62 · 10 ⁻⁴ ; 2,9 · 10 ⁻²)	3

* по данным количественного аминокислотного анализа

боцитов. При этом наиболее адекватным и распространенным вариантом оценки действия препаратов является фотометрический метод регистрации индуцированной агрегации тромбоцитов, который в клинической практике позволяет подобрать индивидуальную дозу антиагреганта и режим его приема.

В таблице 1 представлены значения IC₅₀, соответствующие 50%-му ингибированию агрегации по сравнению с контролем. Согласно этим результатам, все препараты оказывают ингибирующее влияние на агрегацию тромбоцитов человека, причем эффективная доза препарата изменяется в зависимости от структуры N-кон-

цевого аминокислотного остатка. Так, препараты, в которых конформационная подвижность гуанидиновой группировки ограничена за счет ее включения в пятичленный цикл (2 и 6), более эффективны по сравнению с линейной структурой (3). При этом удлинение пептидной цепи приводит к снижению активности (4 и 5). Следует отметить значительное уширение доверительного интервала IC₅₀ для препарата (5), что может быть объяснено разбросом данных из-за проявления индивидуальной чувствительности пациента (рис. 3). Исследование влияния N-концевой аминокислотной группы на антиагрегантную активность аналогов показывает, что ее наличие не является определяющим. Так, препарат (5) сопоставим по активности с пептидом (4). Вместе с тем аналог (7), содержащий гуанидиновую группу аргинина и N-концевую не природную аминокислоту, является эффективным ингибитором агрегации тромбоцитов. Полученные результаты могут объясняться влиянием структурных модификаций на пространственное расположение функциональных групп, необходимых для проявления биологического действия, и, как следствие, различным сродством аналогов с гликопротеиновыми рецепторами тромбоцитов GP II_b/III_a.

В ходе дальнейших экспериментов нами был исследован антиагрегантный эффект аналогов (2, 4 и 5) на фоне облучения плазмы крови красным светодиодом.

Биологические ткани являются интенсивно рассеивающими средами, поглощение которых зависит от их толщины и структуры, а максимум пропускания находится в ближнем инфракрасном диапазоне [9, 10]. Нам не удалось обнаружить литературных данных по определению глубины проникновения красного света в тромбоцитарную плазму. Облучаемая среда обладает сильным рассеянием, т. к. содержит тромбоциты в количестве 140–260 тыс./мкл. Оценочные данные показывают, что глубина проникновения красного света в среду

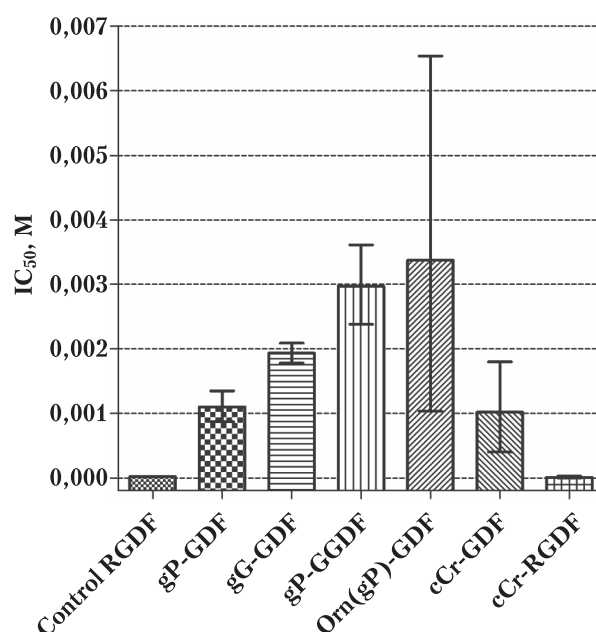


Рис. 3. Результаты биологических испытаний

Влияние пептидов и светодиодного облучения на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека (P=95%)

Облучение, %*	Пептид, %*		Пептид + облучение, %*
—**	gP-GGDF	43,7 ± 2,8	40,3 ± 3,3
—**	gP-GDF	62***	56***
57,7 ± 3,6	Orn(gP)-GDF	39,2 ± 4,2	34,2 ± 2,8

* отношение уровня агрегации в опыте к контролю × 100%;

** экспериментов по облучению контроля не проводили;

*** данные для плазмы одного донора.

не превышала 1–2 мм, поэтому можно предположить, что поглощение квантов красного света происходит в верхнем слое плазмы. Как видно из результатов исследований, представленных в таблице 2, как добавление пептидов, так и облучение плазмы красным светом ингибирует агрегацию тромбоцитов человека. Однако при совместном использовании пептидов и облучения наблюдается их сочетанное антиагрегантное действие.

Таким образом, показано, что замена аргинина в последовательности RGDF на структурно близкие не-

природные аминокислоты увеличивает устойчивость аналогов к ферментативному расщеплению и оказывает существенное влияние на их антиагрегантную активность. Полученные результаты могут быть использованы при поиске эффективных ингибиторов агрегации тромбоцитов на основе фрагментов α-цепи фибриногена.

Для коррекции нарушений реологических свойств крови может быть рекомендовано комплексное воздействие светодиодного облучения красного спектра и пептидов, обладающих антиагрегантной активностью.

Литература

1. Влияние широкополостного некогерентного красного света на метаболизм и функцию эритроцитов // Мат. междунар. конф., 11–14 окт. 1995. — Киев, 1995. — Ч. 1. — С. 14–15.
2. Бриль А. Г., Бриль Г. Е., Киричук В. Ф., Шенкман Б., Тамарин И., Дардик Р., Варон Д., Савион Н. Влияние излучения He-Ne лазера на активацию и агрегацию тромбоцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1999. — Т. 128. — № 7. — С. 48–49.
3. Буров С. В., Москаленко Ю. Е., Лeko М. В., Дорoш М. Ю., Парин Е. Ф. Производные N-амидинопролина и их использование в синтезе пептидов классическим и твердофазным методом // Биоорг. Х. 2006; Т. 32, № 6: С. 565–573.
4. Гаспарян Л. В., Дементьева И. Н. Влияние светодиодного излучения и антиоксидантов на функциональную активность тромбоцитов // Медицинский Академический Журнал. — 2003. — Т. 3, № 2, приложение 4. — С. 17–18.
5. Дерябин Е. И. Влияние некогерентного инфракрасного излучения на репарацию костной ткани нижней челюсти в эксперименте // Стоматология. — 1997. — № 2. — С. 24–25.
6. Есауленко И. Э., Никитин А. В., Васильева Л. В. Клинико-патoфизиологическое обоснование применения различных видов низкоинтенсивного лазерного излучения в клинике внутренних болезней // Журнал теоретической и практической медицины. — 2003. — Т. 1, № 1. — С. 17–20.
7. Карандашов В. И., Петухов Е. В., Зродников В. С. Изменение агрегационной активности тромбоцитов при облучении крови гелий-неоновым лазером и красными светодиодами // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1998. — Т. 126 — № 12. — Р. 645–648.

8. Леонтьева Н. В., Дементьева И. Н. Влияние лазерного излучения различных длин волн на агрегационную активность тромбоцитов // Ученые записки. — 1998. — Т. 5, № 2. — С. 88.
9. Михайлова И. А., Соколов Д. В., Проценко Н. Е., Рябова М. А., Соколов А. В. Лазеры в медицине: методическое пособие. — СПб., СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, 1998. — 108 с.
10. Кирьянова В. В. Антология света // COSMETIC International. — 2003. — № 6. — С. 17.
11. Кирьянова В. В., Линьков В. И., Хаммад И. А., Веселовский А. Б. Применение фотохромотерапии в лечении хронического тонзиллита // Ученые записки. — 2004. — Т. XI, № 4. — С. 59–61.
12. Шитикова А. С. Тромбоцитарный гемостаз. СПб., СПбГМУ, 2000. — 227 с.
13. Andrieux A., Hudry-Clergeon G., Ryckewaert J.-J., Chapel A., Ginsberg M. H., Plow E. F., Marguerie G. Amino Acid Sequences in Fibrinogen Mediating Its Interaction with Its Platelet Receptor, GPIIb/IIIa // J. Biological. Chem. 1989; 264(16): 9258–9265.
14. Bennett J. S., Vilaire G. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine // J. Clin. Invest. 1979; 64(5): 1393–1401.
15. Marguerie G. A., Plow E. F., Edgington T. S. Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen // J. Biol. Chem. 1979; 254(12): 5357–5363.
16. Pollina E. Design and synthesis of RGD mimetics as potent inhibitors of platelet aggregation // J. Undergrad. Sci. 1996, 3: 119–126.
17. Ruoslahti E., Pierschbacher M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins // Science, 1987; 238(4826): 491–497.
18. Schiller P. W. In: Medicinal Chemistry for 21st Century (eds. C. G. Wermuth, N. Koga, H. Konig et al.). — IUPAC/Blackwell Scientific Publications, 1994: 215–32.

КЛИНИКО-ЭКОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОФИЛАКТИКИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ВЕНОЗНЫХ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ

А. В. ВАРДАНЫАН¹, Р. Б. МУМЛАДЗЕ¹, Д. Ю. БЕЛОУСОВ^{2,4}, Е. В. РОЙТМАН⁴

¹ Кафедра общей лазерной и эндоскопической хирургии РМАПО, г. Москва

² Российское общество клинических исследователей, г. Москва

³ Российский научный центр хирургии РАМН, г. Москва

⁴ ООО «Центр фармакоэкономических исследований», г. Москва

Резюме. В статье приводятся результаты проспективного клинико-экономического исследования «затраты/эффективность» (cost-effectiveness analysis/CEA) при профилактике послеоперационных венозных тромбоэмболических осложнений у больных общехирургического и гинекологического профиля. Рассматривались две группы больных: основная и контрольная. В основной группе проводилась фармакопрофилактика фраксипарином, в контрольной группе — не проводилась. Изучалась эффективность профилактики венозных тромбоэмболических осложнений с использованием ультразвукового ангиосканирования (УЗАС) системы нижней полой вены и исследования системы гемостаза.

Установлено, что средняя стоимость лечения на одного пациента составляет 61 186 руб. в ценах 2005 г. Ведущие затраты на лечение — это стоимость койко-дня (60% от прямых затрат), лечение осложнений (24%).

Затраты на профилактику составляют 1% от всех прямых затрат на лечение.

Основной вывод этого исследования состоит в том, что своевременно проведенная антикоагулянтная профилактика у больных с умеренной и высокой степенью риска не только позволяет уменьшить число тромботических осложнений, но и является экономически целесообразной.

Ключевые слова: послеоперационные венозные тромбоэмболические осложнения, антикоагулянты, затраты/эффективность.

CLINICAL AND ECONOMICAL ANALYSIS OF POST-OPERATION VENOUS THROMBOEMBOLIC COMPLICATIONS PREVENTION

A. V. VARDANYAN¹, R. B. MUMLADZE¹, D. JU. BELOUSOV^{2,4}, E. V. ROITMAN⁴

¹ Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Chair of General Laser and Endoscopic Surgery, Moscow

² Russian Society of Clinical Investigators, Moscow

³ Russian Scientific Surgery Center, Russian Medical Sciences Academy, Moscow

⁴ «Center of Pharmacoeconomic Investigations», Moscow

Summary. The article discusses the results of prospective clinical and economical cost-effectiveness analysis (CEA) in prevention of post-operation venous thromboembolic complications in surgical and gynecological patients. In main group pharmacological prevention with fraxiparin was performed, the second one served as control. Efficacy of thromboembolic complications prevention was evaluated by the use of ultrasonic angioscanning of vena cava inferior system and hemostasis system investigation. The results showed that medial cost of one patient treatment is 61 186 roubles according to the prices of 2005. Main costs are related to cost of one clinical day (60% of direct costs) and complications treatment (24%). Prevention costs are 1% of all direct treatment costs. The main conclusion is that the in-time performed anticoagulant prevention in patients with moderate and high risk degree not only gives the possibility to decrease the complications rate but also leads to economical benefits.

Key words: post-operation venous thromboembolic complications; anticoagulants; cost-effectiveness analysis.

Актуальность проблемы

Венозные тромбоэмболические осложнения (ВТЭО), являясь распространенным нарушением системы кровообращения, представляют собой одну из главных проблем здоровья и превышают один случай на 1000 пациентов [18].

Соответственно, в России при численности населения в 2004 г. 144,168 млн человек ВТЭО страдало около 144 тыс. человек [8].

Частота развития послеоперационных тромбозов, по данным разных авторов, составляет от 20 до 59% [8, 16, 20].

Тромбоз глубоких вен нижних конечностей может протекать бессимптомно. Иногда первое и единственное его проявление — массивная тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) [2]. Фактором, инициирующим возникновение тромбоза глубоких вен, является, прежде всего, операция [2, 29, 33]. После различных общехирургических оперативных вмешательств тромбоз глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей развивается в среднем у 29% больных: после гинекологических операций — у 19%, чрезпузырных аденомэктомий — у 38%, протезирования тазобедренного сустава — у 59% [1, 11, 21]

Риск развития ВТЭО остается часто недооцененным среди клиницистов в связи с бессимптомным течением заболевания [22]. Приблизительно 80% всех случаев ТГВ протекают бессимптомно [28, 36]. Среди ВТЭО с фатальным исходом только в 20% случаев симптомы могут быть замечены до смерти [36].

Несмотря на внедрение эффективных профилактических методов в связи с недостаточным их использованием, частота ВТЭО в течение последних 20 лет остается практически неизменной [9, 15, 18].

ТЭЛА прочно удерживает второе-третье место в структуре летальности в стационарах хирургического профиля [27]. У больных, перенесших это осложнение, в течение 3 мес. формируется стойкая легочная гипертензия с прогрессирующим нарушением функции правых отделов сердца [9, 20, 26, 31]. Немаловажен и тот факт, что после первого эпизода эмболии сохраняется вероятность развития рецидива, нередко заканчивающегося смертью больного. Согласно результатам международного многоцентрового исследования по изучению легочной эмболии, риск летального исхода в течение 3 мес. после перенесенной обструкции артериального русла легких существует у 17,5% больных, основной причиной смерти которых служит повторная эмболия [23].

В США ежегодно наблюдаются не менее 2 миллионов пациентов, перенесших ТЭЛА, а в Европе она зарегистрирована более чем у 700 000 пациентов. Однако подобная ситуация характерна не только для западных стран, но и стран Азии, что является основанием для заключения: ВТЭО — проблема мирового здравоохранения [18, 32].

Являясь третьим наиболее часто встречающимся сердечно-сосудистым заболеванием после ишемической болезни сердца и инфаркта, ТЭЛА представляет собой причину тяжелых страданий и смертности и рассматривается как одна из главных проблем здравоохранения и общих экономических затрат. Несмотря на прогресс в профилактике, частота ВТЭО значительно не изменилась за последние 20 лет. Рост общих расходов здравоохранения, связанных с ВТЭО, ожидается в будущем в результате увеличения продолжительности жизни населения и пациентов, имеющих предрасположенность к ВТЭО [18].

Большие расходы при ВТЭО часто связаны с затратами на госпитализацию и с издержками в связи с долгосрочными осложнениями. Прямые расходы на пациентов сопоставимы с издержками, связанными с таковыми при лечении инсультов и инфаркта миокарда, и составляют 9000 долларов для ТГВ и 12 000 — для ТЭЛА в США [14]. Однако расходы на долгосрочный медицинский уход за пациентами с тромбозом глубоких вен более чем в два раза выше, чем затраты на лечение, вследствие рецидивов, развития посттромбофлебитического синдрома, венозных трофических язв и необходимости длительной антикоагулянтной терапии [12, 14].

В Северной Америке затраты на лечение ВТЭО оцениваются приблизительно в 3,2 миллиарда долларов в год, а в Европе они составляют 2,6 миллиарда евро в год [18].

Исследования экономической целесообразности профилактики послеоперационных ВТЭО свидетельствуют о высокой эффективности низкомолекулярных гепаринов по сравнению с нефракционированным гепарином [4].

Цель исследования

Проведение проспективного клинико-экономического анализа «затраты/эффективность» (СЕА) при профилактике послеоперационных ВТЭО.

Материал и методы

Нами проведен проспективный клинико-экономический анализ результатов профилактики послеоперационных венозных тромбоэмболических осложнений у 104 пациентов с 2002 по 2006 гг.

Обследовано 62 (59,6%) общехирургических и 42 (40,4%) гинекологических больных на различных этапах хирургического лечения. Средний возраст больных: $56 \pm 10,4$ лет. Мужчин было 19 (18,3%), средний возраст — $58,7 \pm 9,9$ лет; женщин 85 (81,7%), средний возраст — $56,4 \pm 10,5$ лет.

Критериями отбора считали качественную характеристику умеренной и высокой степени риска развития ВТЭО, предложенную Ch. M. Samama [34].

Данные распределения больных по профилю и риску развития ВТЭО приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика больных по профилю и степени риска развития венозных тромбоэмболических осложнений

Профиль больных	Степень риска, больные (n = 104)	
	Умеренная, абс. число (%)	Высокая, абс. число (%)
Хирургический	46 (44)	16 (15)
Гинекологический	24 (23)	18 (17)
Всего	70 (67)	34 (32)

У пациентов обеих групп для оценки эффективности профилактических мер осуществлялось ультразвуковое ангиосканирование (УЗАС) сосудов системы нижней полой вены (НПВ) на различных этапах оперативного лечения. Основной задачей являлось изучение эффективности методов профилактики ВТЭО у общехирургических и гинекологических больных.

Для диагностики возможной ТЭЛА, в том числе и бессимптомной формы у пациентов с проксимальным уровнем тромботического поражения системы НПВ, проведено перфузионное сканирование (сцинтиграфия) легких.

Гемостазиологическое исследование выполняли для оценки системы гемостаза, контроля за проводимой антитромботической профилактикой на различных этапах лечения с исследованием тромбоцитарного звена и коагуляционной активности.

Пациенты были разделены на две группы. Основная — включала 68 пациентов, а контрольная группа — 36 с умеренным и высоким риском развития ВТЭО. В основной группе у 17 (16%) больных проводили профилактику ВТЭО фраксипарином за 2–12 ч до операции (I подгруппа). У 51 (49%) больного она была проведена в отсроченном режиме через 6–12 ч после операции, в связи с опасностью развития геморрагических осложнений (II подгруппа). В контрольной группе — 36 (35%) больных — профилактика ВТЭО антикоагулянтами не проводилась.

Клинико-экономический анализ

Для доказательства не только эффективности методов профилактики ВТЭО, но и приемлемого соотношения «затраты/эффективность» (cost-effectiveness analysis/CEA) был проведен проспективный клинико-экономический анализ по критерию «затраты/эффективность». Этот анализ подразумевает соотношение затрат с полученными результатами и сравнение двух и более альтернативных медицинских технологий по этому показателю. При этом результаты представляют в виде «натуральных» показателей клинической эффективности [3].

Измерение исходов профилактики выражалось в стоимости за все «предотвращенные события» (тромботические осложнения, смерти от любых причин) в основной группе, где проводилась профилактика ВТЭО фраксипарином, по сравнению с контрольной группой. Все истории болезни исследуемых больных были проанализированы для подсчета затрат. Расчет прямых затрат проводился в два этапа:

- 1) идентификация ресурсов, используемых в исследовании;
- 2) соотнесение их к единице затрат в больнице.

Источники затрат были идентифицированы из историй болезни и сгруппированы следующим образом:

- стоимость лабораторных методов исследования;
- стоимость инструментальных методов исследования;

- стоимость консультации специалистов;
- стоимость лечения осложнений: тромбоза магистральных вен нижних конечностей и ТЭЛА;
- стоимость койко-дня и продолжительность госпитализации;
- стоимость низкомолекулярного гепарина (Фраксипарин, фирмы ГлаксоСмитКляйн, США).

Затраты на хирургическое вмешательство не были включены в анализ.

Показателем эффективности профилактики ВТЭО в нашем исследовании явилась частота тромботических осложнений, выявленная при ультразвуковом ангиосканировании в каждой группе сравнения.

Показатели госпитализации были рассчитаны исходя из российских медико-экономических стандартов (МЭС) и проведенного нами анализа преискурентов лечебно-профилактических учреждений. За основу был взят преискурент 2005 г. на оказание медицинской помощи ГКБ им С.П. Боткина г. Москвы [5].

Затраты, связанные с изучаемым препаратом (фраксипарином) были основаны на реальном количестве дней лечения. Сопутствующая терапия в настоящем исследовании не учитывалась.

Все затраты были подсчитаны по ценам 2005 г. Стоимость лекарственных препаратов рассчитывалась исходя из среднесуточных доз (использовались оптовые цены фармдистрибьютора ЦВ «Протек») [4]. Оптовая стоимость фраксипарина составила на профилактический курс 1415,96 руб.

Для оценки затрат в РФ использовались рубли. На момент расчетов курс доллара США составлял 28,5 руб./\$. В фармакоэкономический анализ были включены все события (смерть, осложнения).

Рассчитываемые показатели

Рассчитывались следующие показатели затрат по стоимости: лабораторных и инструментальных методов исследования, консультаций специалистов, лечения больных с тромботическим поражением вен нижних конечностей, ТЭЛА и смерти, койко-дня и продолжительности госпитализации.

Стоимость лабораторных методов исследования

В лабораторные методы исследования хирургических и гинекологических больных входят: общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимия крови, коагулограмма и другие обязательные анализы (табл. 2).

Как видно из табл. 2, цены ОМС на лабораторные методы исследования существенно отличаются от реальных цен больницы (в 11 раз), поэтому для дальнейшего клинико-экономического анализа рассматривались «реальные» цены.

Затраты на 1 больного на лабораторные методы исследования (два анализа) составили 3160,77 рублей. Как видно из рис. 1, наибольшие затраты приходятся на биохимию крови (34%) и на коагулограмму (27%).

Таблица 2

Лабораторные методы исследования

Код МЭС	Лабораторные методы	Цена ОМС, руб.	«Реальная» цена, руб.
	Общий анализ крови	16,1	145,73
25033	Подсчет лейкоцитарной формулы с определением морфологической формулы элементов крови	8,95	79,79
25054	Определение вязкости крови	5,6	46,97
25016	Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ)	1,56	18,97
	Общий анализ мочи	8,99	182,94
25102	Исследование физических свойств мочи (количество, цвет, прозрачность, относительная плотность, РН)	1,25	15,43
25103	Обнаружение глюкозы в моче экспресс-тестом	0,59	8,48
25108	Обнаружение кетонových тел в моче экспресс-тестом	0,62	27,51
25113	Обнаружение белка в моче с сульфосалициловой кислотой	1,49	21,41
25116	Микроскопическое исследование осадка мочи в норме	5,04	110,11
	Биохимические исследования крови	46,45	588,00
26010	Определение общего белка в сыворотке крови биуретовым методом	3	25,32
26001	Определение глюкозы в крови ортотолуидиновым /глюкозооксидазным методом	5,01	56,06
26081	Определение аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови, оптический тест (АСТ)	3,81	28,37
26082	Определение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови, оптический тест (АЛТ)	3,81	28,37
26029	Определение щелочной фосфатазы в сыворотке крови, оптический тест	3,83	115,66
26016	Определение общего кальция в сыворотке крови с крезол-фталейнкомплексом	3,61	45,26
26020	Определение калия в сыворотке крови ионселективным методом	4,57	85,64
26018	Определение натрия в сыворотке крови ионселективным методом	3,11	31,42
26035	Определение общего билирубина в сыворотке крови (методом Йендрассика—Грофа)	4,18	46,36
26036	Определение фракций билирубина в сыворотке крови (методом Йендрассика—Грофа)	6,06	78,81
26021	Определение хлора в сыворотке крови меркуриметрического титрования	5,46	46,73
	Коагулограмма	50,97	475,31
26061	Обработка венозной крови, включая регистрацию (получение плазмы и сыворотки крови)	2,37	25,19
26056	Определение протромбина (тромбопластинового времени)	1,74	28,00
26064	Определение АЧТВ с эритрофосфатидкоалиновой смесью	7,62	57,46
26033	Определение фибринолитической активности плазмы (время лизиса эуглобулиновой фракции)	10,45	84,61
26032	Определение фибриногена в плазме крови методом ИФА	6,56	98,88
28018	Определение растворимого фибриногена	14,41	119,99

Код МЭС	Лабораторные методы	Цена ОМС, руб.	«Реальная» цена, руб.
26066	Определение тромбинового времени со стандартным количеством тромбина (ТВ)	4,72	35,32
26191	Время свертывания цельной крови по Ли—Уайту	3,1	25,86
	Другие обязательные анализы	41,1	376,81
28054	Определение антител к ВИЧ — ИФА, руч. метод, единичное исследование в плазме	5,11	68,2
28056	Определение HBS антител — ИФА, руч. метод, единичное исследование в плазме	5,1	41,97
28065	Определение антител к HCV антигену — ИФА, руч. метод, единичное исследование в плазме	3,84	30,99
28014	Исследование на сифилис — ИФА, единичное исследование (ручной метод)	5,19	42,15
28019	Определение группы крови сист. АВО стандартными сыворотками или перекрестными	11,27	105,35
28021	Определение резус-фактор, конглотинация с желатином/экспресс	10,64	88,15
ИТОГО		163,67	1768,79
Сумма двух анализов «реальная»		3160,77 руб.	
Сумма двух анализов ОМС		286,19 руб.	

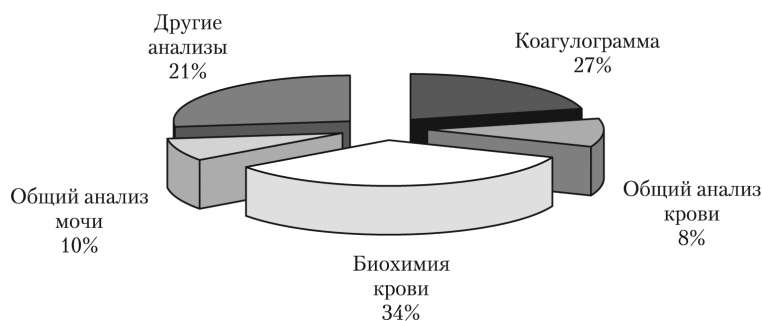


Рис. 1. Распределение затрат на лабораторные методы исследования в процентном отношении

Стоимость инструментальных методов диагностики

В инструментальные методы исследования, используемые у всех больных хирургического и гинекологического профиля входят: ЭКГ, рентгеноскопия (графия) грудной клетки, исследование функции внешнего дыхания, новые, сложные ультразвуковые технологии и эзофагогастродуоденоскопия (табл. 3).

Как видно из табл. 3, цены ОМС существенно отличаются от реальных цен больницы (в 9 раз), поэтому для дальнейшего клинико-экономического анализа рассматривались «реальные» цены на инструментальные методы диагностики.

Затраты на инструментальные методы исследования на 1 больного различались в зависимости от профиля пациента (хирургический или гинекологический) и характера заболевания (табл. 4). Так, к примеру, следует

Таблица 3

Инструментальные методы диагностики

Код МЭС	Инструментальные методы	Цена ОМС, руб.	«Реальная» цена, руб.
40124	Новые, сложные ультразвуковые технологии	129,18	999,61
22101	ЭКГ (в 12-ти отведениях), 6-канальный неавтоматический электрокардиограф	19,31	157,26
22312	Комплексное исследование функции внешнего дыхания	94,94	780,80
35002	Rg-графия органов грудной клетки	41,58	585,48
21021	Эзофагогастродуоденоскопия диагностическая	73,60	726,45
21026	Ректосигмоколоноскопия диагностическая	135,51	1310,65
40001	УЗИ органов гепатобиллиарной системы (печень, желчный пузырь и пр.)	38,77	299,94
40003	УЗИ селезенки	24,97	199,84
40021	УЗИ внутренних женских половых органов	1,34	249,98
40032	УЗИ почек, надпочечников и забрюшинного пространства	38,05	299,94
40082	Эхокардиография (в комплексе В- и М-реж)	64,60	499,90
38006	Сцинтиграфия легких перфузионная	31,41	496,36
37006	Компьютерная томография брюшной полости	235,36	2205,52
37029	Магнитно-резонансная томография брюшной полости	209,29	1960,17

Таблица 4

Различия в стоимости инструментальной диагностики в зависимости от профиля

Профиль больных	Заболевания	Стоимость, руб.
Гинекологический профиль	Эндометриоз с миомой, выпадение половых органов, миома матки, рак эндометрия тела матки	4 358,22
Хирургический профиль	Грыжи	5 434,57
	Рак желудка, канцероматоз тонкой кишки	5 884,39
	Желчно-каменная болезнь, кишечная непроходимость, острый аппендицит	5 934,35
	Рак прямой кишки, рак ободочной кишки	7 195,04

отметить, что существенные отличия цены на инструментальную диагностику рака желудка и канцероматоза тонкой кишки от рака ободочной и прямой кишки связано с дополнительно проведенным исследованием — ректосигмоколоноскопией (разница 1310,65 руб.).

Стоимость консультации специалистов

Консультации специалистов отличаются в зависимости от хирургического и гинекологического профиля больных (табл. 5).

Как видно из табл. 5, цены ОМС на консультации специалистов существенно отличаются от реальных цен больницы (в 9 раз), поэтому для дальнейшего клинико-экономического анализа рассматривались «реальные» цены.

Затраты на консультации специалистов на 1 больного различались в зависимости от профиля пациента (хирургический или гинекологический), характера заболевания и необходимости гинекологического обследования (табл. 6).

Таблица 5

Консультации специалистов

Код МЭС	Консультация специалиста	Цена ОМС, руб.	«Реальная» цена, руб.
1701	Терапевт КДЦ	30,97	303,54
1727	Гинеколог КДЦ	31,24	321,23
1749	Врач ЛФК в стационаре	17,89	148,41
1703	Гастроэнтеролог КДЦ	30,23	268,58
1712	Невропатолог КДЦ	30,11	249,12
1705	Эндокринолог КДЦ	30,93	300,55
1722	Онколог КДЦ	33,49	291,03
1702	Кардиолог КДЦ	30,04	252,30
1716	Пульмонолог КДЦ	30,11	249,12

Таблица 6

Различия в стоимости консультаций специалистов в зависимости от профиля

Профиль больных	Заболевания	Стоимость, руб.
Хирургический профиль	Грыжи, желчно-каменная болезнь, острый панкреатит	451,95
	Желчно-каменная болезнь, острый панкреатит, кишечная непроходимость, острый аппендицит	773,18
	Рак прямой кишки, рак желудка, канцероматоз тонкой кишки, рак ободочной кишки	1355,24
Гинекологический профиль	Эндометриоз с миомой, выпадение половых органов, миома матки	451,95
	Рак эндометрия тела матки	1034,01

Таблица 7

Стоимость лечения венозных тромбоэмболических осложнений

Код МЭС	Название осложнения	Койко-дни	Цена койко-дня ОМС, руб.	Цена койко-дня «реальная», руб.	Цена ОМС, руб.	Цена «реальная», руб.
72.091	Тромбоз магистральных вен	24	268,02	2399,13	6432,37	57579,06
72.070	Тромбоэмболия легочной артерии	24	263,58	2616,60	6326,03	62798,46
3052	Вскрытие гематомы				29,61	290,24
1561	Констатация факта смерти				18,72	195,51
59001	Аутопсия (вскрытие) 1-й категории сложности				676,37	4746,84

Таблица 8

Различия в стоимости лечения осложнений

Осложнения	Стоимость, руб.
Вскрытие гематомы	290,24
Тромбоз магистральных вен	57 579,06
Тромбоз магистральных вен, тромбоэмболия легочной артерии	120 377,52
Тромбоэмболия легочной артерии, констатация факта смерти, аутопсия (вскрытие) 1-й категории сложности	67 740,41

Стоимость лечения больных с тромботическим поражением вен нижних конечностей, тромбоэмболией легочной артерии, смерти и других осложнений

Как видно из табл. 7, цены ОМС на лечение осложнений существенно отличаются от реальных цен больницы (в 9 раз), поэтому для дальнейшего клинико-экономического анализа рассматривались «реальные» цены.

Затраты на лечение осложнений на 1 больного различались в зависимости от характера осложнений (ТГВ, ТЭЛА, гематома, смерть). Наиболее дорогостоящее оказалось лечение больных при ТГВ и ТЭЛА (табл. 8).

Стоимость койко-дня и продолжительность госпитализации

Стоимость одного койко-дня по ценам ОМС отличается от реальных цен больницы (в 10 раз), поэтому для дальнейшего клинико-экономического анализа рассматривались «реальные» цены. Затраты на 1 больного на койко-дни различаются в зависимости от профиля пациента (хирургический или гинекологический) и характера заболевания (табл. 9).

Результаты и обсуждения

В основной группе больных, где антикоагулянтная профилактика проводилась до операции (I подгруппа)

Таблица 9

Стоимость койко-дня в зависимости от профиля больных и характера заболевания

Профиль	Характер заболевания	Койко-дни	Стоимость койко-дней ОМС, руб.	Стоимость койко-дней «реальная», руб.
Хирургический	Желчно-каменная болезнь	12	1559,33	15583,73
	Острый аппендицит	10	2491,79	27599,02
	Грыжи передней брюшной стенки	15	3074,51	36106,75
	Канцероматоз тонкой кишки	21	5372,80	59715,65
	Рак ободочной кишки	24	5591,26	48751,14
	Рак прямой кишки	18	5651,14	65705,11
	Рак желудка	35	7895,77	68880,04
	Кишечная непроходимость	14	5225,83	69605,39
	Острый панкреатит	20	8001,13	81208,45
Гинекологический	Миома с эндометриозом	14	3017,22	30251,73
	Миома матки	14	3017,22	30251,73
	Выпадение половых органов	12	3616,43	42625,82
	Рак эндометрия тела матки	35	9828,92	85402,56

Таблица 10

Тромботические осложнения в зависимости от проводимой фармакопрофилактики, как критерии отбора основной и контрольной групп

Послеоперационные тромбозы	Фармакопрофилактика (фраксипарин). Основная группа (n = 68)		Контрольная группа (n = 36)
	Профилактика за 2–12 часов до операции, n = 17	Профилактика в течение 6–12 часов после операции, n = 51	Без профилактики, n = 36
	абс. число (%)	абс. число (%)	абс. число (%)
Тромбозы в системе НПВ,	—	3 (6)	22 (61)
в том числе ТЭЛА	—	1 (2)	1 (3)

Таблица 11

Стоимость лечения исследуемых больных (n = 104) по «реальным» ценам

Виды затрат	Стоимость, руб.
Койко-дни исследуемых больных	3 816 720,64
Профилактика фраксипарином	86 722,05
Лабораторные методы исследований	328 720,08
Инструментальные методы исследований	545 231,92
Консультации специалистов	68 050,27
Осложнения	1 517 945,95
ИТОГО на 104 больных	6 363 390,91
В среднем на 1 больного	61 186,45

Таблица 12

Стоимость лечения исследуемых больных (n = 17), которым профилактика антикоагулянтами проводилась до операции (по «реальным» ценам)

Виды затрат	Стоимость, руб.
Койко-дни исследуемых больных	639 145,59
Профилактика фраксипарином	24 071,32
Лабораторные методы исследований	53 733,09
Инструментальные методы исследований	83 073,57
Консультации специалистов	10 393,02
Осложнения	—
ИТОГО на 17 больных	810 416,59
В среднем на 1 больного	47 671,56

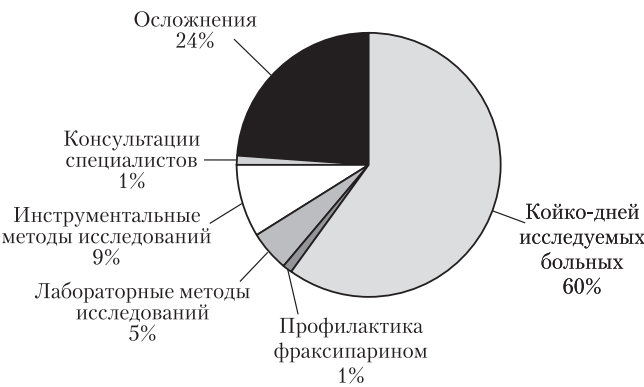


Рис. 2. Распределение в процентном отношении затрат на обследование и профилактику ВТЭО исследуемых больных (n = 104)



Рис. 3. Распределение в процентном отношении затрат на обследование и лечение больных (n = 17), которым профилактика антикоагулянтами проводилась до операции (по «реальным» ценам)

Таблица 13

Стоимость лечения исследуемых больных (n = 51), которым профилактика антикоагулянтами проводилась после операции (по «реальным» ценам)

Виды затрат	Стоимость, руб.
Койко-дни исследуемых больных	1 732 864,77
Профилактика фраксипарином	62 650,73
Лабораторные методы исследований	161 199,27
Инструментальные методы исследований	268 535,44
Консультации специалистов	31 912,12
Осложнения	188 408,17
ИТОГО на 51 больного	2 445 570,50
В среднем на 1 больного	47 952,36

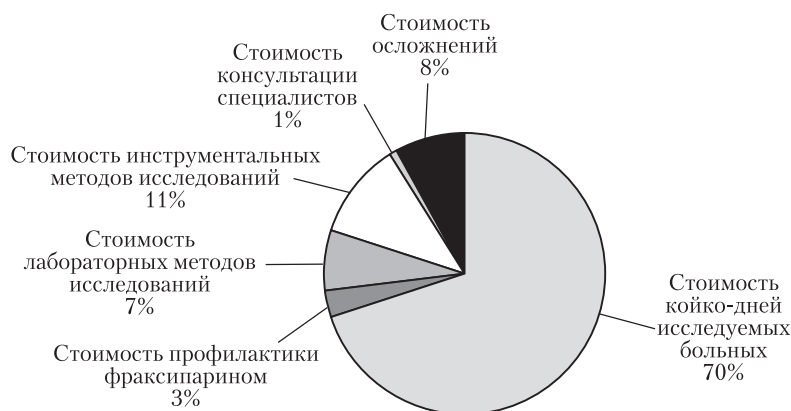


Рис. 4. Распределение в процентном отношении затрат на обследование и лечение больных (n = 51), которым профилактика антикоагулянтами проводилась после операции (по «реальным» ценам)

тромботических осложнений при УЗАС не обнаружено, во II подгруппе у 3 (6%) больных, которым профилактика была проведена в отсроченном режиме, выявлены тромбозы в системе НПВ, в т. ч. ТЭЛА у 1 (2%) больного. В контрольной группе, где профилактика антикоагулянтами не проводилась, тромботические поражения обнаружены у 22 (61%) больных, в т. ч. у 1 (3%) больного выявлена ТЭЛА (табл. 10).

В связи с этим следует отметить, что частота возникновения тромбозов вен нижних конечностей в послеоперационном периоде достигает от единичных случаев до 71% по данным различных исследований, что связано с применяемыми методами и частотой исследования больных независимо от симптоматики [4].

Для дальнейшего сравнения затрат и эффективности нами представлена стоимость лечения исследуемых больных по реальным ценам больницы, включающая общую

стоимость исследований в целом у всех 104 больных, с учетом стоимости койко-дня и фармакопрофилактики, проведенной фраксипарином (табл. 11).

Как видно из рисунка 2, стоимость фраксипарина не влияет на общие затраты лечения больных.

Среди основной группы больных (I подгруппа), которым фармакопрофилактика проводилась до операции и отсутствовали тромботические осложнения, стоимость лечения представлена в табл. 12 и на рис. 3.

В основной группе больных (II подгруппа), которым фармакопрофилактика проводилась в отсроченном режиме (в интервале 6–12 часов после операции), имелись тромботические осложнения, стоимость лечения представлена в табл. 13 и на рис. 4.

В контрольной группе больных, где профилактика антикоагулянтами не проводилась и имелось увеличение частоты тромботических осложнений, стоимость исследования больных представлена в табл. 14 и на рис. 5.

Таблица 14

Стоимость лечения исследуемых больных (n = 36), которым профилактика антикоагулянтами не проводилась, — группа контроля (по «реальным» ценам)

Виды затрат	Стоимость, руб.
Койко-дни исследуемых больных	1 444 710,28
Профилактика фраксипарином	—
Лабораторные методы исследований	113 787,72
Инструментальные методы исследований	193 622,91
Консультации специалистов	25 745,13
Осложнения	1 329 537,78
ИТОГО на 36 больных	3 107 403,82
В среднем на 1 больного	86 316,77

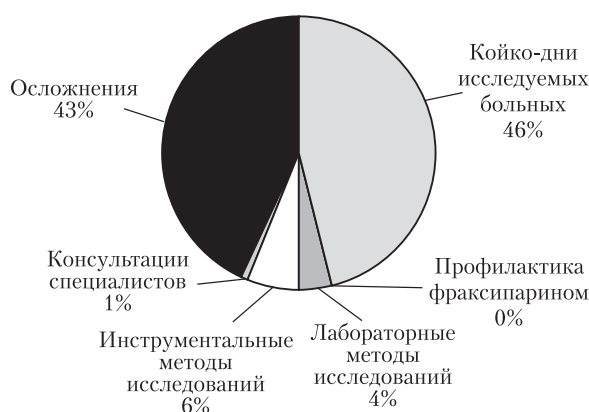


Рис. 5. Распределение в процентном отношении затрат на обследование и лечение больных (n = 36), которым профилактика антикоагулянтами не проводилась, — группа контроля (по «реальным» ценам)

Наиболее экономически оправданным является применение антикоагулянтной профилактики ВТЭО до проведения оперативных вмешательств.

Наличие всех представленных выше данных дает возможность выполнить анализ показателя «затраты/эффективность» (CER), который рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Затраты}_{\text{I подгруппа}} - \text{Затраты}_{\text{II подгруппа}}$$

$$\text{Количество ТГВ}_{\text{I подгруппа}} - \text{Количество ТГВ}_{\text{II подгруппа}},$$

где

$$\begin{aligned} \text{Затраты}_{\text{I подгруппа}} = & \text{стоимость}_{\text{койко-день}} + \text{стоимость}_{\text{профилактика}} + \text{стоимость}_{\text{лаб. исслед.}} + \text{стоимость}_{\text{инстр. исслед.}} + \\ & + \text{стоимость}_{\text{консульт.}} + \text{стоимость}_{\text{осложнен.}} \end{aligned}$$

$$\text{Количество ТГВ}_{\text{I подгруппа}} = \text{наличие случаев ТГВ в I подгруппе в процентах}$$

$$\text{Количество ТГВ}_{\text{II подгруппа}} = \text{наличие случаев ТГВ во 2 подгруппе в процентах}$$

Расчет показателей «стоимость/эффективность» групп сравнения

Показатели	Основная группа		Контрольная группа
	I подгруппа	II подгруппа	
Затраты в среднем на 1 больного, руб.	47 671,56	47 952,36	86 316,77
Эффективность, %	100	94	39
CER, руб. (стоимость 1% эффективности)	476,71	510,13	2 213,25

Как видно из таблицы 15, наименьший показатель «стоимость/эффективность» (CER) в основной группе, где была произведена фармакопрофилактика фраксипарином. В основной группе наименьший CER был в подгруппе I, где фармакопрофилактика фраксипарином проводилась до операции.

Выводы

При экономическом анализе установлено, что средняя стоимость лечения на одного пациента в больнице составляет 61 186 руб. в ценах 2005 г. Ведущие затраты на лечение — это стоимость койко-дня, которая составила 60% от прямых затрат; на втором месте среди затрат — лечение осложнений (24%). Инструментальные, лабораторные исследования, консультации специалистов не оказывают существенного влияния на стоимость лечения (9, 5 и 1% соответственно). Затраты на профилактику в больнице составляют всего 1% от всех прямых затрат на лечение больных хирургического и гинекологического профиля.

При подсчете затрат на лечение больных без профилактики средняя стоимость составила 86 316 руб. на одного больного; с проведенной фармакопрофилактикой до операции — 47 671 руб., а после операции — 47 952 руб.

Эффективность профилактики у больных составила соответственно в основной группе: I подгруппа — 100%, II подгруппа — 94%, в контрольной группе — 39%.

Коэффициент «стоимость/эффективность» CER был наименьшим в I подгруппе больных, у которых антикоагулянтная профилактика ВТЭО была проведена до операции — 476 руб. за 1% эффективности.

Таким образом, своевременно проведенная антикоагулянтная профилактика у больных с умеренной и высокой степенью риска развития ВТЭО позволяет не только уменьшить число тромботических осложнений, но и является экономически целесообразной.

Литература

1. Баешко А. А. и др. Послеоперационный тромбоз глубоких вен нижних конечностей и эмболия легочной артерии. Хирургия, 1999; 3: 52–58.
2. Савельев В. С. 50 лекций по хирургии. М.: 2003; 20: 92–99.

3. Баешко А. А. Послеоперационные венозные тромбозы: эпидемиология и профилактика. Ангиология и сосудистая хирургия, 2001; Т. 1: 105–120.

4. Воробьев П. А., Авксентьева М. В., Юрьев А. С., Сура М. В. Клинико-экономический анализ. Издательство «Ньюдиамед», М.: 2004; 404.

5. Кириенко А. И. и др. Проблема послеоперационных венозных тромбозов и осложнений в хирургической практике. Ангиология и сосудистая хирургия, 2003; 9: 1: 61–65.

6. Прайс-лист ЦВ «Протек», от 17.10.2005 г., www.protek.ru.

7. Прейскурант на оказания медицинских услуг ГКБ им. С. П. Боткина г. Москвы, 2005 г.

8. Российский статистический ежегодник, 2004.

9. Савельев В. С. Послеоперационные венозные тромбозы: фатальная неизбежность или контролируемая опасность? Хирургия, 1999; 6: 60–63.

10. Anderson F. A., Jr., Wheeler H. B., Goldberg R. J., Hosmer D. W., Forcier A., Patwardhan N. A. Physician practices in the prevention of venous thromboembolism. Ann. Intern. Med., 1991; 115: 8: 591–595.

11. Anderson F. A., Jr., Wheeler H. B., Goldberg R. J., Hosmer D. W., Forcier A., Patwardhan N. A. Changing clinical practice. Prospective study of the impact of continuing medical education and quality assurance programs on use of prophylaxis for venous thromboembolism. Arch. Intern. Med., 1994; 154: 6: 669–677.

12. Bergqvist D. et al. Prevention of venous thromboembolism. London: Med-Orion, 1994; 402.

13. Bergqvist D., Jendteg S., Johansen L., Persson U., Odegaard K. Cost of long-term complications of deep venous thrombosis of the lower extremities: an analysis of a defined patient population in Sweden. Ann. Intern. Med., 1997; 126: 6: 454–457.

14. Bick R. L. Therapy for venous thrombosis: guidelines for a competent and cost-effective approach. Clin. Appl. Thromb. Hemost., 1999; 5: 1: 2–9.

15. Bick R. L. Proficient and cost-effective approaches for the prevention and treatment of venous thrombosis and thromboembolism. Drugs, 2000; 60: 3: 575–595.

16. Bratzler D. W., Raskob G. E., Murray C. K., Bumpus L. J., Piatt D. S. Underuse of venous thromboembolism prophylaxis for general surgery patients: physician practices in the community hospital setting. Arch. Intern. Med., 1998; 158: 17: 1909–1912.

17. Coidiz W. G. A. et al. Lancet. 1986; 2: 143–146.

18. Dahl O. E., Gudmundsen T. E., Bjørnara B. T., Solheim D. M. Risk of Clinical PE after Joint Surgery in Patients Receiving In-Hospital Low-Molecular-Weight Heparin Prophylaxis — A 10-Year Prospective Registry of 3,954 Patients. Acta Orthopaedica Scandinavica, 2003; In press.

19. DECISIONMATRIX™ для профилактики венозной тромбоэмболии (ВТЭО). Индивидуализация риска венозной тромбоэмболии

(ВТЭО) для пациентов терапевтического и хирургического профиля.

20. Douketis J. D., Eikelboom J. W., Quinlan D. J., Willan A. R., Crowther M. A. Short-Duration Prophylaxis Against Venous Thromboembolism After Total Hip or Knee Replacement: A Metaanalysis of Prospective Studies Investigating Symptomatic Outcomes. Arch. Intern. Med., 2002; 162: 13: 1465–1471.

21. Eklof B. et al. Surgery of the Veins. Grime and stratlion. Orlando (Florida), 1985; 131–145.

22. European Consensus Statement. Prevention of venous thromboembolism. Nicosia: Med-Orion, 1991; 20.

23. Geerts W. H., Heit J. A., Clagett G. P., Pineo G. F., Colwell C. W., Anderson F. A. et al. Prevention of venous thromboembolism. Chest, 2001; 119(1): 132S–175S.

24. Goldhaber S. Z. et al. International cooperative pulmonary embolism registry detects high mortality rate. Circulation, 1997; 96: Suppl. 1–159. Abstract.

25. Heit J. A., Mohr D. N., Silverstein M. D., Petterson T. M., O'Fallon W. M., Melton L. J., III. Predictors of recurrence after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population based cohort study. Arch. Intern. Med., 2000; 160: 6: 761–768.

26. Heit J. A. Venous thromboembolism epidemiology: implications for prevention and management. Semin. Thromb. Hemost., 2002; Suppl. 2: 3–14.

27. Huber S., McMaster K. J., Voetkerding K. V. Analytical evaluation of primer engineered multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (or detection of factor V Leiden and prothrombin G20210A). 1. Mol. Diagn. 2000; 2: 153–157.

28. Keltey M. A. et al. Clin. Chest. Med., 1994; 15: 3: 547–560.

29. Lethen H., Flachskampf F. A., Schneider R., Sliwka U., Kohn G., Noth J. et al. Frequency of deep vein thrombosis in patients with patent foramen oval and ischemic stroke or transient ischemic attack. Am. J. Cardiol., 1997; 80: 8: 1066–1069.

30. Lord R. V. et al. The incidence of deep venous thrombosis after laparoscopic cholecystectomy. Med. J. Aust., 1996; 164: 402–405.

31. Madhok R., Lewallen D. G., Wallrichs S. L., Ilstrup D. M., Kurland R. L., Melton L. J., III. Trends in the utilization of primary total hip arthroplasty, 1969 through 1990: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. Mayo Clin. Proc., 1993; 68: 1: 11–18.

32. Moser KM. Venous thromboembolism. Amer. Rev. Respir. Dis., 1990; 141: 235–249.

33. NIH Consensus Conference. Prevention of venous thrombosis and pulmonary embolism. JAMA, 1986; 256: 6: 744–749.

34. Poort S. R., Rosendaat F. R., Reitsma P. I., Bertina R. M. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood, 1996; 88: 3698–3703.

35. Prandoni P., Lensing A. W., Cogo A. The long-term clinical course of acute deep-vein thrombosis. Annals of Internal Medicine, 1996; 125: 1–7.

36. Samama Ch. M., Samama M. M. Prevention of venous thromboembolism. Congress of European Society of Anaesthesiology. Amsterdam, 1999; 39–43.

37. Sandler D. A., Martin J. F. Autopsy proven pulmonary embolism in hospital patients: are we detecting enough deep vein thrombosis? J. R. Soc. Med., 1989; 82: 4: 203–205.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ
КОНСИЛИУМ

ПО ВОПРОСАМ СОТРУДНИЧЕСТВА И РАЗМЕЩЕНИЯ РЕКЛАМЫ



в научно-практическом журнале
«Клинико-лабораторный консилиум»
просим обращаться в редакцию:

Эмануэль Владимир Леонидович

e-mail: evl@spmu.rssi.ru

моб. тел. 8 (901) 306-70-03

Чередниченко Денис Владимирович

e-mail: cheredni1@gmail.com

тел./факс (812) 233-97-26

NYCOMED

Мировой стандарт в современной антикоагулянтной терапии

ВАРФАРИН НИКОМЕД

Показания к применению

- острый венозный тромбоз и эмболия легочной артерии (вместе с гепарином);
- послеоперационный тромбоз;
- повторный инфаркт миокарда;
- в качестве дополнительного мероприятия при проведении хирургического или медикаментозного (тромболитического) лечения тромбоза, а также при электрической конверсии мерцания предсердий;
- рецидивирующий венозный тромбоз;
- повторная эмболия легочной артерии;
- наличие протезов сердечных клапанов или протезов кровеносных сосудов (возможна комбинация с ацетилсалициловой кислотой);
- тромбоз периферических, коронарных и мозговых артерий;
- вторичная профилактика тромбоза и тромбоэмболии после инфаркта миокарда и при мерцании предсердий.

Лечение и профилактика тромбозов и эмболии



www.warfarin.ru
www.nycomed.ru

ТЕСТ «ГАСТРОПАНЕЛЬ» ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДКА

А. Б. ДРЫГИНА*, Н. А. БИГЕЛЬДИНА**

* ФГУЗ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины МЧС России, Санкт-Петербург

** ООО «Биохит», Санкт-Петербург

Резюме. На протяжении последних лет разрабатываются и совершенствуются иммуноферментные тест-системы для диагностики заболеваний желудка. Пионером в этом направлении стала компания «Biohit Diagnostics» (Финляндия), которая в конце 2000 года приступила к выпуску уникальной тестовой панели «GastroPanel» («ГастроПанель»). С помощью «ГастроПанели» в сыворотке крови проводится определение четырех показателей: наличие антител к *H. pylori*, уровни гастрин-17, пепсиногена I и пепсиногена II. Компьютерная обработка полученных результатов по программе «ГастроСофт» дает возможность выявлять пациентов с повышенным риском развития рака желудка, диагностировать атрофический гастрит, локализацию патологического процесса и его распространенность, а также установить, ассоциировано ли заболевание желудка с инфекцией *H. pylori*. Данный обзор посвящен характеристике сывороточных маркеров заболеваний желудка, преимуществам и ограничениям их использования в лабораторной практике.

Ключевые слова: гастрин-17, пепсиноген I, пепсиноген II, антитела к *Helicobacter pylori*, атрофический гастрит.

«GASTROPANEL» TEST IN STOMACH DISEASES DIAGNOSTICS

L. B. DRYGINA, PH. D.*, N. A. BIGELDINA, M. D.**

* Federal State Health Institution «All-Russian center of emergency and radiation medicine of EMERCOM of Russia», Saint-Petersburg

** Biohit Ltd., Saint-Petersburg

Summary. During last several years the immunoenzyme test systems for stomach diseases diagnosis have been worked out, successfully used and modified. The pioneer company developing the method was «Biohit Diagnostics» (Finland), which started the unique test panel «GastroPanel» production at the end of 2000. «GastroPanel» gives possibility to measure four indicators: presence of *H. pylori* antibodies, levels of gastrin-17, pepsinogen I and pepsinogen II. Computer analysis of obtained results by «GastroSoft» program gives possibility to reveal patients with high risk of gastric cancer, to diagnose the atrophic gastritis, to evaluate the localization and size of pathological process as well as determine presence of association of the disease with *H. pylori* infection. Present review is devoted to characteristics of serum markers of stomach diseases, possibilities and limitations of their use in laboratory practice.

Key words: gastrin-17, pepsinogen I, pepsinogen II, antibodies *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis.

Заболевания желудка относятся к широко распространенным болезням. Чаще всего клиницисты сталкиваются с проявлениями органической или функциональной диспепсии, имеющей многообразную симптоматику. Согласно Римским критериям II (1999) синдром диспепсии определяется как ощущение боли или дискомфорта (тяжесть, переполнение, раннее насыщение), локализованное в подложечной области ближе к срединной линии [15]. Эти жалобы многообразны и могут быть обусловлены как различными желудочно-кишечными заболеваниями или пищевой непереносимостью, так и системными заболеваниями. Действительно, у половины пациентов с гастроэнтерологическими жалобами выявляется функциональная диспепсия. У остальных — симптомы диспепсии связаны с проявлением органической патологии: язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки (ДПК), гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ), панкреатитами и др. Доказано,

что в этиологии и патогенезе синдрома функциональной диспепсии значительное место занимает инфекция *Helicobacter pylori*. Хроническое воспаление, возникающее в слизистой оболочке желудка (СОЖ) в ответ на *H. pylori*-инфекцию, приводит к развитию цепи морфологических реакций: острому, хроническому, атрофическому гастриту, кишечной метаплазии, дисплазии и раку желудка [7]. Поэтому основная задача врача заключается в проявлении настороженности относительно тех желудочно-кишечных заболеваний, которые влекут за собой осложнения или predisposing к возникновению злокачественной опухоли.

До настоящего времени для диагностики заболеваний желудка применялось изолированное выявление инфекции *H. pylori*, назначение пробной медикаментозной терапии или эндоскопическое обследование. Недавно был разработан и запатентован принципиально иной подход к диагностике, который основан на определении

Достоверность результатов диагностики атрофического гастрита с помощью теста «ГастроПанель» в сравнении с гистологическим методом исследования [1]

Метод	«ГастроПанель»	Гистологическое исследование
Общая достоверность	81%	77–85%
Чувствительность	79%	69–89%
Специфичность	91%	88–94%
Положительное прогностическое значение (PPV)	64%	54–75%
Отрицательное прогностическое значение (NPV)	93%	90–96%

в сыворотке или плазме крови четырех биомаркеров: пепсиногена I (PGI), пепсиногена II (PGII), гастрин-17 (G17) и антител к *H. pylori* (*анти-Hp*), количественное определение которых дает информацию о функциональном состоянии различных участков СОЖ [14]. Этот комплекс показателей получил коммерческое название тест «ГастроПанель» (GastroPanel), а программное обеспечение для обработки результатов анализов — «ГастроСофт» (GastroSoft). Наборы реагентов для теста «ГастроПанель» выпускаются компанией «Biohit Diagnostics» (Финляндия).

Определение пепсиногена I, пепсиногена II, гастрин-17 основано на сэндвич-методе ELISA — твердофазном иммуноферментном анализе. Принцип ELISA заключается в следующем. На первом этапе анализа свободные формы пепсиногена I (пепсиногена II или гастрин-17), присутствующие в исследуемом образце сыворотки крови пациента, за счет двухвалентного взаимодействия образуют специфические иммунные комплексы с моноклональными антителами, адсорбированными на поверхности лунок полистироловых планшетов, и вторыми антителами. Далее биотинилированный IgG присоединяется ко вторым антителам. Авидин, меченый пероксидазой хрена, обеспечивает усиление реакции определения ферментативной активности и биохимическое выявление образованного иммунного комплекса за счет авидин-биотинового взаимодействия.

Н. Vaananen и соавт. (2003) провели мультицентровое исследование по использованию «ГастроПанели» для неинвазивной диагностики заболеваний желудка. В исследование было включено 404 пациента с диспепсией [1]. Результаты, полученные с помощью теста «ГастроПанель», сравнивались с результатами гистологического метода (табл. 1).

Авторами показана высокая достоверность верификации атрофического гастрита как при серологическом исследовании крови с помощью теста «ГастроПанель», так и при проведении гастроскопии с гистологическим исследованием биоптатов. Так же были получены сопоставимые результаты по определению здоровой СОЖ. Эти фундаментальные исследования финских ученых

послужили отправной точкой к широкому использованию теста «ГастроПанель» в клинической практике при скрининге пациентов.

Семейство «гастринов» и пепсиногены

В 1905 г. Джон Сидней Эдкинс (J. S. Edkins) из Лондонского университетского колледжа впервые выделил из вытяжки антрального отдела желудка млекопитающих гормон «гастрин». Гормон стимулировал секрецию соляной кислоты. Позднее было доказано существование целого семейства гастринов, обладающих сходным биологическим действием. В настоящее время это хорошо изученная группа гормонов, имеющих одинаковую пентапептидную структуру.

Семейство гастринов не претерпело существенных изменений в процессе эволюции. Так, гормоны млекопитающих — гастрин, холецистокинин обладают высокой степенью гомологии с нейропептидом прехордовых — хионином и пептидом, выделенным из кожи лягушки, — церулеином. Рецепторы гастрин связывают холецистокинин и другие пептиды, имеющие похожие биологически активные участки.

Синтез гастрин стимулируется как белками, поступающими с пищей, так и растяжением желудка. В результате чего образуются α-амидированные биоактивные гастрины, имеющие одинаковые участки на С-конце полипептидной последовательности, состоящие из четырех аминокислотных остатков: —Trp—Met—Asp—PheNH₂. Пятую позицию от С-концевого фенилаланиламида (—PheNH₂) занимает глицин (—Gly), а шестую — тирозин (—Tyr).

Основная часть (90%) амидированных гастринов представлена амидом 17-членного пептида, его также называют *маленьким гастрином* (G17); 5% — *большим гастрином* G34 (34 остатка); остальные 5% — смесью *большого-большого гастрин* (71 и 52 остатка), *мини-гастрин* (14 остатков) и короткого гепта- и гексапептидного аминного фрагмента.

Амидированные гастрины, в основном, вырабатываются антральными G-клетками. Они обладают в 100 раз большей активностью в отношении высвобож-

дения гистамина по сравнению с гастринами, заканчивающимися глицином. Амидированные гастринины могут существовать в двух формах — несulfатированной и О-sulfатированной по тирозиновому остатку. Исключение составляет гастрин G6, который полностью sulfатирован. Sulfатированная форма G17 в 1000 раз более эффективно стимулирует секрецию соляной кислоты слизистой желудка, чем гистамин. В экстрактах слизистой антрального отдела желудка преобладают более короткие формы гастрининов, а в сыворотке — более длинные. В слизистой антрального отдела желудка в основном (90%) представлен амидированный гастрин-17, а в тонком кишечнике — гастрин-34.

Синтез и высвобождение амидированных гастрининов в кровеносное русло происходит максимально через 20 мин. после белковой нагрузки, в этот момент G17 стимулирует секрецию соляной кислоты. Высокая кислотность ($\text{pH} < 2,5$) угнетает дальнейшую секрецию G17 по механизму отрицательной обратной связи.

В процессе биосинтеза гастрининов образуется около 5–10% неамидированных гормонов, аминокислотная последовательность этих соединений заканчивается глицином. Неамидированные формы гастрининов не обладают биологической активностью и поступают преимущественно в кровь. Местом синтеза неамидированных гастрининов могут быть клетки дистального отдела тонкого кишечника, клетки толстого кишечника, ЕС-клетки фетальной и неонатальной поджелудочной железы, клетки гипofиза, мозжечковые нейроны и нейроны блуждающего нерва, яичники в постменопаузальный период, сперматогенные клетки. Из клеток или тканей, которые в норме экспрессируют ген гастрина, образуются опухоли.

При гастриноме или синдроме Золлингера—Эллисона развивается гипергастринемия, обусловленная гиперпродукцией гастрина G-клетками опухоли. Гастриномы могут локализоваться в области поджелудочной железы, ДПК или других органов и тканей.

Биоактивные продукты имеют разное время выведения из организма, что отражается на их гормональной значимости. Чем больше молекула, тем больше время ее выведения из организма.

Гастринины регулируют регенерацию слизистой желудка, стимулируют пролиферацию ECL-клеток, моторику желудка, секрецию холецистокинина, секрецию поджелудочной железы. При стрессорном воздействии G-клетки увеличивают секрецию гастрина с измененной молекулярной структурой: преимущественно синтезируются неамидированные гастринины; меньше образуется sulfатированных форм амидированных гастрининов.

Гастрин-17 оказывает выраженное влияние на кислотную продукцию в теле желудка, причем его активность наивысшая из всех известных гастрининов. Это доминирующая и сильнодействующая форма гастрина в здоровой СОЖ. Было предложено использовать данный показатель в качестве биологического маркера атрофии

антрального отдела желудка, поскольку при атрофии слизистой антрального отдела секреция G17 снижается. Для этого компанией «Biohit» (Финляндия) был разработан метод количественного определения гастринина-17 в доступном биологическом материале — сыворотке крови. Биоактивные гастринины более иммуногенны, чем неактивные (заканчивающиеся глицином), за счет присутствия ароматического кольца PheNH_2 в молекулярной структуре соединения. Однако моноклональные антитела к биоактивным гастрининам могут вступать в перекрестные реакции не только с G17, но и с другими гастрининами, присутствующими в сыворотке крови. Эта проблема была успешно решена финскими исследователями. Чувствительность разработанного метода анализа позволила определять базальный гастрин-17. Показано отсутствие перекрестных реакций со структурными аналогами биоактивного G17 (табл. 2).

Американский гастроэнтеролог М. Samloff с соавт. (1975) стал основоположником определения пепсиногенов в сыворотке крови серологическим методом [12]. В начале 80-х годов им была выявлена корреляционная зависимость между концентрацией в сыворотке крови пепсиногенов, определяемых методом иммунодиффузии, и степенью тяжести поражения желудка по результатам гистологического исследования биоптатов СОЖ [13]. Иммунологический метод определения пепсиногенов получил название «серологической биопсии» и является малоинвазивным способом оценки пептической секреции желудка.

Из слизистой желудка человека выделены два пепсиногена — пепсиноген I (PGI) и пепсиноген II (PGII). Пепсиноген I, или пепсиноген А, является предшественником (зимогеном) фермента пепсина. Пепсиноген II, или пепсиноген С, относится к группе аспарагиновых протеаз, которые превращаются в пепсин под действием кислой среды желудочного сока. В процессе активации с N-конца пепсиногенов (неактивных форм) отщепляются аминокислотные остатки в виде смеси пептидов, некоторые из этих пептидов могут действовать как ингибиторы пепсина. PGI синтезируется главными клетками слизистой оболочки тела желудка. Уровень пепсиногена I достоверно коррелирует с количеством главных клеток в слизистой тела желудка. В случае тяжелого атрофического гастрита происходит потеря главных клеток, что приводит к снижению PGI. Клетки, секретирующие PGII, представлены практически в каждой железе желудка и Бруннеровых железах ДПК. Сывороточный уровень пепсиногена II отражает состояние СОЖ. В табл. 3 показано распределение пепсиногенов у человека.

Таким образом, PGI секретируется исключительно в области тела и дна, а PGII — во всех отделах желудка. Поэтому определение уровней PGI и PGII, а также их соотношение может дать важную информацию о гистологическом и функциональном состоянии слизистой желудка.

Таблица 2

Специфичность ИФА тест-системы «Biohit»
для количественного определения G17 в сыворотке крови

Пептид	Гастрин-17 ELISA Biohit (% от результата радиоиммунологического исследования)
Несульфатированный гастрин 2–17	0
Гастрин 1–13	0
Несульфатированный гастрин-17	104,3 ± 4,1
Сульфатированный гастрин-17	37,8 ± 4,6
Несульфатированный гастрин-34	0

Таблица 3

Распределение пепсиногенов в организме человека

	Пепсиноген I	Пепсиноген II
Тело и дно желудка	+	+
Антральный отдел желудка	–	+
Двенадцатиперстная кишка	–	+
Сыворотка	+	+
Моча	+	–
Семенная жидкость	–	+

Секреция G17 регулируется с помощью отрицательной обратной связи между pH в просвете желудка и уровнем пепсиногенов. Наличие высокого уровня G17 при низком уровне PGI подтверждает диагноз атрофического гастрита с поражением тела желудка. С другой стороны, высокая концентрация G17 может свидетельствовать о гипо- и ахлоргидрии. Напротив, низкий уровень сывороточного G17 отмечается у пациентов с атрофическим гастритом в антральном отделе желудка, чаще всего такие пациенты инфицированы *H. pylori*. Низкие концентрации G17 и PGI могут подтверждать распространенное поражение стенки желудка. При аномально низком уровне сывороточного G17 повышается риск развития рака и язвенной болезни желудка.

Определение уровня гастрин-17 в сыворотке или плазме крови может использоваться при верификации диагноза гипергастринемий неопухолевой или опухолевой природы. При последних — уровень G17 не увеличивается, в отличие от форм гастрин-17 с высокой молекулярной массой. Определение G17 также может быть использовано для наблюдения за пациентами, подвергшимися хирургическому лечению. После успешной антрэктомии секреция G17 в общий кровоток практически равна нулю.

Наблюдается четкая положительная зависимость между уровнями сывороточного PGI и выработкой соляной кислоты. Большинство заболеваний верхних отделов желудочно-кишечного тракта являются кислото-

зависимой патологией, и адекватное лечение состоит в назначении препаратов, ингибирующих желудочную секрецию. Таким образом, определение PGI дает информацию об эффективности лечения этих заболеваний. Большое количество исследований показало значительное повышение уровня PGI у пациентов с неатрофическим *H. pylori*-ассоциированным гастритом. Тем не менее для объективной оценки уровня PGI важно исключить факторы, способные влиять на его секрецию, например, ингибиторы протонной помпы. Согласно некоторым сообщениям, уровень PGI повышен у курящих и употребляющих алкоголь, особенно у людей, не инфицированных *Hp*.

**Бактериальные патогенетические факторы
H. pylori-инфекции**

В 1983 г. В. Marshall и R. Warren выделили со слизистой оболочки желудка и исследовали бактерии, которые получили название *Helicobacter pylori* [11, 16]. *H. pylori* представляют собой мелкие граммотрицательные жгутиковые микроаэрофильные палочки. Впоследствии была доказана ведущая роль *H. pylori*-инфекции в патогенезе многих заболеваний верхних отделов желудочно-кишечного тракта. За свое открытие в 2005 г. ученые становятся лауреатами Нобелевской премии в области медицины и физиологии.

Описаны разнообразные патогенетические механизмы воздействия *H. pylori* на слизистую оболочку

желудка. Неоднозначность трактовки механизмов вирулентности *H. pylori* связана с тем, что исследования проводились либо *in vitro* на изолированных колониях микроорганизмов, либо на моделях животных, инфицированных *H. pylori*, а затем экстраполировались на организм человека. В настоящее время их можно разделить на три группы:

- 1) факторы колонизации;
- 2) факторы персистенции;
- 3) факторы, индуцирующие заболевание.

Факторы колонизации

— Подвижность.

Подвижность *H. pylori* обусловлена наличием от 2 до 6 полярных защищенных жгутиков (флагелл), кодируемых генами *flaA* и *flaB*. Ген *flaA* является главным в обеспечении подвижности бактерии. Оболочка флагелл выполняет защитную роль, поскольку представляет собой мембрану, содержащую протеины и липополисахариды, обеспечивающие адгезию молекул на ее поверхности.

— Уреаза.

В процессе своей жизнедеятельности *H. pylori* продуцирует уреазу. Это никельсодержащий фермент, синтезируемый субъединицами UreA и UreB. Уреаза разлагает мочевины до CO₂ и ионов аммония, тем самым создается нейтральная среда вокруг микроорганизма, защищающая бактерию от пагубного действия желудочного сока.

— Бактериальная адгезия и рецепторы.

Липидные рецепторы СОЖ — фосфатидилэтанол-амин и ганглиотетраосилкерамид — обеспечивают связывание *H. pylori*. Бактериальный адгезин *H. pylori*, который распознает эти липиды, представляет собой S-подобный экзоэнзим 63 кДа. *H. pylori* агглютинирует эритроциты. Геммагглютинины (фетуин), продуцируемые *H. pylori*, вызывают адгезию и бактериальную колонизацию микроорганизма на слизистой желудка. В зависимости от вида микроорганизмов происходит переменная экспрессия отдельных адгезинов, что объясняет различие бактериального связывания различных представителей хеликобактеров со слизистой. Фетуин ингибирует бактериальное связывание с клетками желудка. Специфическое связывание с поверхностью слизистых клеток в складках желудка стимулируется фукозилатными структурами гликопротеинов. Было обнаружено, что антигены группы крови Lewis стимулируют воздействие на клетки желудка. Кроме того, наличие этих фукозилированных рецепторов различно у людей с разными фенотипами групп крови. Например, у людей с фенотипами А и В их меньше, у людей с фенотипом группы О их больше. Это объясняет высокий риск развития язв желудка у людей с фенотипом группы О [6]. Другими потенциальными рецепторами для связывания *H. pylori* со слизистой являются компоненты внеклеточного матрикса, которые экспрессируются в

ответ на высокую микробную активность. *H. pylori* также связывается с ламинином, f1-фибронектином, различными коллагенами и гепарансульфатом.

Факторы персистенции

— Механизмы выживания.

Выделяемый *H. pylori* сурфактант (высокоактивный фосфолипид) защищает бактерию от соляной кислоты, вырабатываемой в желудке. Помимо этого клетки *H. pylori* содержат полифосфатные гранулы, которые действуют как резерв запаса энергетических веществ, необходимый для ее автономного жизнеобеспечения.

— Изменения иммунитета.

При хеликобактериозе наблюдается гуморальный иммунный ответ, однако образующиеся антитела не обладают протективным действием. По отношению к клеточному ответу этот ответ супрессирован. Частичная резистентность уничтожения *H. pylori* фагоцитами, возможно, связана с повреждением аммонием фагосомальной мембраны. В отличие от других бактериальных инфекций в ответ на *H. pylori*-инфекцию липополисахариды, которые обычно являются активными иммуностимуляторами, не вызывают высокой продукции токсических кислородных радикалов и цитокинов.

Соли висмута и антибиотики способствуют переходу *H. pylori* в коккоподобную форму с интактными мембранами и полифосфатным энергетическим резервом. Эти коккоподобные формы отличаются от дегенеративных коккоподобных форм, которые образуются в процессе старения хеликобактера.

— Адаптивные протеины.

Железо является важным элементом для роста и метаболизма бактерий. На поверхности *H. pylori* имеются рецепторы для связывания железосодержащих протеинов.

H. pylori может продуцировать белки, аналогичные белкам теплового шока человека Hsp60 [10]. Hsp60 является антигеном, расположенным на бактериальной поверхности.

Факторы патогенности

— Цитотоксичность.

Ген *cagA*, кодирующий протеин 128 кДа, необходим для экспрессии функционального цитотоксина CagA. Активность цитотоксина усиливается белком VacA 87 кДа.

Методы лабораторной диагностики *Нр*-инфекции

Род *Helicobacter* насчитывает примерно 30 видов, выделяемых от людей и животных. Хеликобактериоз относится к числу антропонозных инфекций. Наиболее распространенными видами, обитающими в желудке человека, являются *H. pylori*, небольшую часть составляют *H. heilmannii* и *H. cinaedi*. Пути передачи человеку окончательно не выяснены. Предполагается, что люди заражаются преимущественно алиментарным путем.

К видам *Helicobacter spp.*, которые были выявлены в желудке кошек и собак, относятся *H. pylori*, *H. heilmanii*, *H. bizzoironii*, *H. bitis*. Представители *Helicobacter spp.* имеют некоторые общие морфологические признаки, но различаются по патогенности. Было показано, что уреазные субъединицы *H. felis* (UreA, UreB) гомологичны с *H. pylori*, хотя уреазы *H. pylori* и *H. pylori* не идентичны по последовательности ДНК и антигенности. Липидные рецепторы СОЖ обеспечивают связывание не только *H. pylori*, но и *H. mustelae*. Попадая в желудок человека, эти микроорганизмы могут участвовать в развитии острой воспалительной реакции, но в отличие от *H. pylori* они легко выводятся при проведении адекватного лечения.

Широкая распространенность хеликобактерной инфекции и необходимость оптимизации терапевтических схем ее эрадикации стимулировали появление разнообразных лабораторных способов выявления *H. pylori*.

Все методы диагностики *H. pylori*, используемые в настоящее время, можно разделить на две большие группы — прямые и непрямые (косвенные) (табл. 4).

Прямые методы позволяют непосредственно выявлять *H. pylori*. Непрямые методы основаны на определении косвенных параметров, например, продуктов жизнедеятельности бактерии, уровня специфических антител к антигенам *H. pylori*.

По способу взятия материала для исследования методы диагностики *H. pylori* подразделяются на инвазивные (исследование биоптатов) и неинвазивные (серологические, дыхательные, ПЦР в кале и слюне).

Спектр лабораторных тестов включает бактериологические, гистологические, биохимические, серологические, молекулярно-генетические исследования *H. pylori*-инфекции. Они используются для проведения эпидемиологических исследований, при первичном выявлении *H. pylori* и для контроля эффективности лечения хеликобактериоза.

При выборе метода определения *H. pylori* в первую очередь необходимо учитывать его диагностическую чувствительность и специфичность. Российской гастроэнтерологической ассоциацией и Российской группой по изучению *H. pylori* в 1997 г. для первичной диагностики *H. pylori*-инфекции были рекомендованы четыре

Таблица 4

Методы диагностики *Hp*-инфекции

Метод	Вещество, антиген или субстрат	Комментарии
Бактериологический	Биоптаты СОЖ; сложные питательные среды; сложные условия культивирования	Прямой инвазивный метод; специфичность 100%; выделение культуры; определение антибиотикорезистентности
Морфологический	Биоптаты СОЖ и мазки-отпечатки; окраска по Романовскому—Гимзе; по Грамму; серебрение по Warthin—Starry	Прямой инвазивный метод; оценка состояния СОЖ; «золотой стандарт» диагностики <i>H. pylori</i>
Иммуноцитохимический Иммуногистохимический	Биоптаты СОЖ и мазки-отпечатки; поликлональные антитела к лизатам <i>H. pylori</i>	Прямой инвазивный метод; выявление коккоподобных форм <i>H. pylori</i> ; широко не используется
ПЦР	Слюна, кал	Прямой метод; оценка патогенности <i>H. pylori</i> по отдельным генам
Иммуноферментный анализ (ИФА)	Лизат <i>H. pylori</i> ; комбинация лизатов и рекомбинантных белков; синтетические пептиды	Непрямой неинвазивный метод; скрининговые исследования; определение IgA, IgM, IgG и антигенов <i>H. pylori</i>
Блот-техники (Western-blot)	Рекомбинантные белки	Высоко специфичен; используется в основном как подтверждающий метод
Экспресс-тесты (CLO-тест; Heli-pil-тест и др.)	Выявление уреазной активности гастробиоптата	Непрямой инвазивный экспресс-метод; ложноположительные реакции дают другие грамотрицательные бактерии
Уреазный дыхательный	¹³ C- или ¹⁴ C-мочевина	Непрямой неинвазивный метод; постановка анализа только в условиях специализированных лабораторий; «золотой стандарт» эффективности эрадикации у детей

лабораторных метода, непосредственно выявляющие бактерию или продукты ее жизнедеятельности в организме больного [5].

Бактериологический

Основным преимуществом метода является возможность выявления чистой культуры *H. pylori* при посеве материала на дифференциально-диагностическую среду, изучение морфологических свойств микроорганизма и определение антибиотикорезистентности. Специфичность бактериологического метода составляет 100%.

В последние годы усовершенствованы методы хранения и культивирования *H. pylori*. *H. pylori* выделяют из биоптата СОЖ, слюны, кала и сыворотки крови. Микроорганизм быстро погибает в воздушной среде, т. к. является микроаэрофилом, биоптат сразу после взятия должен быть помещен в транспортную среду. Показано, что транспортировка на среде Cary–Blair при температуре 4–15° С позволяет увеличить время доставки материала в бактериологическую лабораторию до 48 ч. Для роста микроорганизма используют селективную питательную среду, обогащенную циклодекстрином с добавками препаратов, подавляющих рост сопутствующей микрофлоры. Культивирование *H. pylori* проводится в микроаэрофильных условиях в атмосфере 5% CO₂. Обычно колонии *H. pylori* появляются через 3–5 дней. Оптимизация условий культивирования при температурном режиме от 4 до 30° С позволила получить рост бактерий в течение 48 ч. Показана возможность длительного хранения культуральной среды (в течение 2 лет) при –70° С в присутствии глицерола.

Трудоемкость и дороговизна бактериологического метода ограничивает его широкое использование.

Морфологический

«Золотым стандартом» диагностики *H. pylori* является окраска бактерии в гистологических препаратах СОЖ по Гимзе, толуидиновым синим, серебрение по Warthin–Starry. Преимущество метода заключается в возможности не только выявить бактерию, но и оценить состояние слизистой оболочки желудка. Существенным недостатком метода является продолжительность исследования, которая может достигать до 7 дней. Метод может быть использован для определения не только *H. pylori*, но и *H. heilmannii*.

Для цитологического исследования используются мазки-отпечатки. Метод не дает полной информации о состоянии СОЖ.

В последнее время получили развитие **иммуноцитохимические** и **иммуногистохимические** методы исследования с использованием аффинных поликлональных антител к лизатам *H. pylori*. Эти методы используются для выявления коккоподобных форм микроорганизма, но они не дают информации о вегетативной способности *H. pylori*.

Уреазный дыхательный

Определение в выдыхаемом больным воздухе изотопов ¹⁴С или ¹³С, образующихся в результате расщепления в желудке больного радиоактивно меченой мочевины под действием уреазы *H. pylori*. Дыхательный тест эффективен сразу после окончания эрадикационной терапии. Мочевина после попадания ее в желудок человека, инфицированного *H. pylori*, под воздействием уреазы подвергается гидролизу, в результате которого образуется углекислый газ, содержащий меченый атом углерода. Он попадает в кровоток, а затем выделяется через легкие. Увеличение экскреции меченого углекислого газа в выдыхаемом воздухе используется как маркер наличия *H. pylori* в желудке.

Экспресс-тесты

Определение уреазной активности в биоптате СОЖ путем помещения его в реакционную среду, содержащую мочевины и индикатор. Под действием уреазы *H. pylori* мочевина разлагается на СО₂ и ионы аммония. При накоплении в реакционной среде ионов аммония цвет индикатора меняется. Метод используется для экспресс-диагностики *H. pylori*. К существенным недостаткам метода относится то обстоятельство, что уреазные тесты дают представление о наличии *H. pylori* только на ограниченном участке СОЖ. Ложноположительные результаты уреазного теста могут быть связаны с присутствием в верхних отделах ЖКТ уреазо-позитивных микроорганизмов *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcal species* и других представителей *Helicobacter spp.*

В 2005 г. Третьим Московским соглашением гастроэнтерологов к числу методов первичной диагностики *H. pylori* были добавлены серологические и молекулярно-генетические исследования (ПЦР) [2].

Полимеразная цепная реакция

Материалом для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) по выявлению антигенов *H. pylori* может служить биоптат слизистой оболочки желудка, кал, зубной налет, моча. В этом заключается универсальность метода. Двухпраймерный ПЦР-анализ биопсийного материала позволяет добиться чувствительности 96% и специфичности 100%. С помощью методов ПЦР возможно выявление коккоподобных форм *H. pylori*.

В последнее время ПЦР проводится не столько для выявления *H. pylori*, сколько для выявления штаммов *H. pylori*. ДНК-типирование позволяет определять полиморфизм генов, кодирующих уреазу или другие специфические белки *H. pylori*.

Серодиагностика

Серологические тесты широко используются в клинической практике как на стадии выявления микроорганизма, так и после применения антихеликобактерной терапии.

Таблица 5

Антигены *H. pylori*

Н-антигены (жгутиковые)	Fla A Fla B	Фактор подвижности; Фактор подвижности
О-антигены (группоспецифические)	Lp	Липополисахарид
Основные видоспецифические антигены	CagA VacA UreA UreB Hsp60	Основной маркер патогенности — 128 кДа; Цитотоксин, фактор адгезии — 87 кДа; Малая субъединица уреазы; Большая субъединица уреазы; Белок теплового шока — 60 кДа

Таблица 6

Характеристика тест-систем ELISA для выявления антител к *H. pylori*

Наименование тест-системы	Адсорбированные антигены	Результат определения	Ед. изм.
ELISA «БИОНИТ»	Афинноочищенный белок CagA	IgG/IgA к антигену CagA <i>H. pylori</i>	Иммуноферментные единицы (EIU)
IMMULITE 2000 «DPC»	Лизаты культуры <i>H. pylori</i>	IgG к антигенам <i>H. pylori</i>	Индекс позитивности
IMMUNOCOMB II «БИОГРАД-ОРДЖЕНИКС»	Лизаты культуры <i>H. pylori</i>	IgG к антигенам <i>H. pylori</i>	Титр антител
Хеликобактер- антитела «ВЕКТОРБЕСТ»	Рекомбинантный белок CagA	Суммарные антитела к антигену CagA <i>H. pylori</i>	+/- (качественный анализ)

Колонизация СОЖ *H. pylori* вызывает появление различных классов антител против антигенов бактерии. Наличие антител к *H. pylori* в сыворотке крови является следствием реактивного ответа и свидетельствует об инфицированности организма. Выявление антител к *H. pylori* проводится серологическими методами. Самым распространенным серологическим методом является иммуноферментный анализ (ИФА). С помощью ИФА тест-систем в настоящее время можно проводить не только определение различных классов специфических иммуноглобулинов, но и выявлять антитела к различным антигенам *H. pylori* (табл. 5).

В России для диагностики *H. pylori* зарегистрированы серологические тесты на основе сэндвич-метода ИФА. Характеристики некоторых тест-систем для выявления антител к *H. pylori* представлены в табл. 6.

Преимуществом методик является простота выполнения. Это неинвазивные методы. Их используют для эпидемиологических исследований при назначении терапии и скрининга пациентов.

Вместе с тем результаты определений уровня антител к *H. pylori* с помощью различных диагностических наборов не всегда совпадают. Это зависит, во-первых, от структуры антигенов *H. pylori*, которые использованы производителями диагностической продукции для создания конкретной тест-системы; во-вторых, от выявляемого класса иммуноглобулинов. При исполь-

зовании лизатов культуры *H. pylori* возможны ложноположительные реакции с антителами к роду хеликобактеров — *H. felix*, *H. mustelae*, *H. heilmannii*. В большинстве методов ИФА проводится определение антител класса IgG, некоторые методы — позволяют выявлять IgA.

Перспективным материалом для ИФА являются слюна и моча. Специфичность определения IgG в моче хорошо коррелирует с уровнями *H. pylori* в слюне и сыворотке у инфицированных пациентов. Чувствительность и специфичность определения IgG в моче методом ИФА составляет 95,9% и 90% соответственно. Разработка ИФА методов определения уровня антител к *H. pylori* в моче является перспективной в отношении диагностики инфекции, прогноза и мониторинга эффективности эрадикации.

Большие перспективы в оценке патогенности штаммов *H. pylori* получили методы анализа антител к цитотоксинассоциированному белку CagA. Возможность использования рекомбинантного антигена CagA (128 кДа) обеспечивает чувствительность и специфичность анализа более 96%, сопоставимую с Вестерн-блотом (Western-blot). Пациенты с наличием антител к CagA в большей степени подвержены риску развития язвенной болезни и рака желудка. Пациенты с язвой двенадцатиперстной кишки имели значительно более высокий ответ на этот антиген, чем пациенты с хрони-

ческими гастритами. После успешной эрадикации титр IgG снижается.

Первичный диагноз *H. pylori*-инфекции при обнаружении бактерии одним из перечисленных выше методов является достаточным для начала эрадикационной терапии. Под эрадикацией подразумевают полное уничтожение вегетативных и коккоподобных форм *H. pylori* в желудке и ДПК. Диагностика эрадикации должна осуществляться как минимум двумя из указанных диагностических методов через 4–6 нед. после окончания курса антихеликобактерной терапии. Причины несоответствия результатов выявления *Hp* различными методами анализа могут заключаться в следующем:

Тест «ГастроПанель»:

— От преаналитического этапа анализа зависит правильность определения гастрин-17; базальный уровень гастрин-17 повышается, если пациенты обследуются не после 10-часового голодания, а после пищевой стимуляции.

— Использование тест-систем разных производителей может приводить к высокой степени вариабельности уровней *анти-Hp*, т. к. определяются разные классы иммуноглобулинов (А, G, М или суммарные антитела), выявляются антитела к различным антигенам бактерии.

Уреазные экспресс-тесты:

— Малый размер биоптата (составляет 0,25% от всей поверхности СОЖ).

— Биоптат получен из сильно поврежденной части СОЖ.

— При наличии сопутствующей микрофлоры *Streptococcus species*, *Staphylococcus species*, *Proteus* тест дает ложноположительный ответ.

ПЦР, иммуноцитохимия, гистология, морфология:

— Квалификация специалиста, проводящего исследование.

— Не оценивается жизнеспособность *H. pylori*, особенно коккоподобных форм.

— Могут выявляться непатогенные представители *Helicobacter spp.*

Исследователями Европейской группы по изучению *Hp* (2005 г.) рекомендовано использование серологичес-

кого метода, как теста, исключающего ложноотрицательные результаты, в отличие от других методов, после проведенного лечения блокаторами протонной помпы и антибиотиками [3].

Интерпретация результатов исследования крови с помощью теста «ГастроПанель»

Сывороточные уровни пепсиногенов (I и II) и гастрин-17 количественно отражают состояние всей слизистой оболочки желудка, ее функциональную активность и тяжесть атрофических изменений. Референтные интервалы для показателей теста «ГастроПанель» представлены в табл. 7.

Уровень PGI коррелирует с количеством главных клеток тела желудка. С увеличением тяжести атрофического гастрита в теле желудка снижаются концентрации пепсиногена I и пепсиногена II, а также их соотношение в анализе крови.

Важной характеристикой любого лабораторного метода анализа является его ROC-кривая (receiver operating characteristic), которая отражает зависимость частоты истинно положительных результатов при определенной патологии (клиническая чувствительность) от частоты ложноположительных результатов (клиническая специфичность). Универсальным методом оценки ROC-кривых является вычисление площади под кривой. Она может меняться от 0,5 (отсутствие диагностической эффективности теста) до 1,0 (максимальная эффективность теста).

Значения чувствительности и соответствующие им доли ложноположительных результатов для каждого из четырех показателей теста «ГастроПанель», рассчитанные по всему диапазону точек разделения между нормой и патологией, наносятся на соответствующие графики и соединяются плавной линией. Т. Tiisanen и соавт. в 2006 г. показали, что при атрофическом гастрите тела желудка наиболее информативными являются два маркера — PGI и соотношение PG I/II (www.gastropanel.net). Значения площади под ROC-кривыми для PGI и соотношения PG I/II близки к 1,0. Это позволило сделать заключение, что PGI и PG I/II являются маркерами выбора при данной патологии СОЖ. Снижение концен-

Таблица 7

Референтные интервалы показателей теста «ГастроПанель»

Показатель	Референтный интервал, ед. изм.
Пепсиноген I	30–120 мкг/л
Пепсиноген II	3–10 мкг/л
Пепсиноген I/II	3–20
Гастрин-17 стимулированный (G17s)	5–30 пмоль/л
Гастрин-17 базальный (G17b)	2–10 пмоль/л
<i>Анти-Hp</i> IgG/IgA	0–30 EIU

Таблица 8

Изменение параметров теста «ГастроПанель» при различных состояниях СОЖ

	PGI	PGII	PGI/II	G17b	G17s	Анти-Нр
Атрофический гастрит тела желудка	↓		↓	↑		
Атрофический гастрит антрального отдела желудка				↓	↓	↑
Атрофический гастрит тела желудка и антрального отдела	↓	↓		↓	↓	
Неатрофический гастрит		↑				
Неатрофический гастрит, <i>H. pylori</i> -инфекция		↑				↑
Эзофагеально-рефлюксная болезнь (ГЭРБ)				↓		

↓ — снижение показателя; ↑ — повышение показателя.

трации PGI менее 30 мкг/л и PG I/II менее 3 свидетельствуют о выраженной атрофии тела желудка. Третьим маркером при атрофическом гастрите тела желудка можно считать G17. Уровень гастрина-17 по механизму отрицательной обратной связи зависит от кислотности. Поскольку при атрофическом гастрите тела желудка теряются обкладочные клетки, то чем ниже уровень соляной кислоты, тем выше концентрация G17. Выявление антител к *H. pylori* не зависит от степени атрофических изменений в теле желудка.

Соответственно, с увеличением тяжести атрофического гастрита в антральном отделе желудка снижается концентрация гастрина-17 (исключая гиперхлоргидрию или другие состояния, способные ингибировать G-клетки). В норме базальный уровень G17 составляет менее 2,5 пмоль/л, при высокой кислотности и отсутствии *H. pylori*-инфекции — может не определяться. При хеликобактерной инфекции уровень сывороточного G17 резко возрастает. Гастрин играет ключевую роль в регуляции кислотопродукции.

Поскольку PGII вырабатывается во всех отделах желудка, его уровень при наличии инфекции *H. pylori* повышается независимо от топографии воспалительных изменений в желудке. Повышение концентрации сывороточного PGII более 10 мкг/л связано с воспалительным процессом любой этиологии в СОЖ. Таким образом, PGII является маркером выбора при неатрофическом гастрите.

Суммируем основные назначения показателей теста «ГастроПанель»:

Пепсиноген I	— маркер атрофии тела желудка;
Пепсиноген I/II	— маркер атрофии тела желудка;
Пепсиноген II	— маркер воспаления СОЖ или атрофии;
Гастрин-17 ст.	— маркер атрофии антрального отдела желудка;
Гастрин-176	— маркер повышенной кислотности (ГЭРБ, пищевод Баррета);
Анти-Нр IgG/IgA	— маркер <i>H. pylori</i> -инфекции.

В таблице 8 представлена общая картина изменения показателей теста «ГастроПанель» в зависимости от состояния СОЖ.

Соотношения уровней сывороточных показателей теста «ГастроПанель» были использованы при разработке программного обеспечения «ГастроСофт». Стохастическая версия «ГастроСофт» позволяет с высокой степенью вероятности предсказать наличие различных состояний слизистой оболочки желудка:

- 1) норма (N),
- 2) атрофический гастрит антрального отдела (A),
- 3) атрофический гастрит тела желудка и антрального отдела (AC),
- 4) атрофический гастрит тела желудка (C), и
- 5) неатрофический гастрит (S) (табл. 9).

Обследование с помощью теста «ГастроПанель» является безопасным способом наблюдения за возможными изменениями в СОЖ, поэтому его целесообразно

Таблица 9

Диагностические критерии теста «ГастроПанель»

	Изменение показателей
N	<i>Anti-Hp</i> < 38 EIU PGI > 25 мкг/л G17s > 0,1 пмоль/л
C	<i>Anti-Hp</i> < или > 38 EIU PGI < 25 мкг/л G17s > 10 пмоль/л
AC	<i>Anti-Hp</i> < или > 38 EIU PGI < 25–50 мкг/л G17s < 5 пмоль/л или G17s > 5–10 пмоль/л
S	<i>Anti-Hp</i> > 38 EIU PGI > 25–50 мкг/л G17s > 5–10 пмоль/л
A	<i>Anti-Hp</i> > 38 EIU PGI > 25 мкг/л G17s < 5 пмоль/л

проводить до назначения эндоскопического исследования. Подобный подход позволит оптимизировать эндоскопическое исследование и забирать биопсийный материал с критических участков СОЖ, первоначально выявленных с помощью теста «ГастроПанель». Результаты, полученные с помощью теста «ГастроПанель», приблизительно в 80% случаев коррелируют с результатами гастроскопии и биопсии [1]. В зависимости от результатов анализа и симптомов пациента программа «ГастроСофт» дает информацию о возможном риске развития рефлюкс-эзофагита и пищевода Баррета.

Основные области применения теста «ГастроПанель»:

— для более точной диагностики заболеваний желудка как первоначальный диагностический тест.

Согласно рекомендациям совещания Маастрихт-3 (2005), скрининг с помощью теста «ГастроПанель» рекомендуется проводить среди близких родственников пациентов с раком желудка; среди лиц с язвенной болезнью, MALT-лимфомой, атрофическим гастритом, среди пациентов с резекцией по поводу рака желудка [4].

Направлению на обследование с помощью теста «ГастроПанель» также подлежат пациенты с дефицитом витамина B12, кальция, железа, высоким уровнем гомоцистеина.

Дефицит витамина B12 приводит к повышению уровня гомоцистеина в сыворотке крови и тканях. Высокий уровень гомоцистеина в настоящее время рассматривают как самостоятельный фактор риска по развитию атеросклероза, поражению сосудов сердца и мозга [8].

Витамин B12 вырабатывается исключительно микроорганизмами и поступает с пищей. При атрофии СОЖ наблюдается нарушение всасывания витамина B12. Это происходит в результате того, что атрофическая слизистая тела желудка перестает вырабатывать внутренний фактор и гаптокоррин — белки, принимающие непосредственное участие в транспорте витамина B12 и аккумуляции его запасов в печени и почках. Дефицит витамина B12 приводит к нарушению деятельности нервных тканей и целому ряду неврологических патологий, которые без своевременной диагностики могут принять необратимый характер [9].

Заключение

Современный иммунохимический лабораторный метод определения гастрин-17, пепсиногенов I и II, уровня антител к *H. pylori* в сыворотке крови является универсальным инструментом оптимизации алгоритма верификации кислотозависимых заболеваний желудка. Скрининговые исследования с помощью теста «ГастроПанель» позволяют уменьшить число ошибок, связанных с неправильным использованием других лабораторных тестов, а также снизить затраты на обследование при необоснованном назначении гастроскопии.

Литература

1. Ваананен Х., Ваухконен М., Хэлске Т. и др. Неэндоскопическая диагностика атрофического гастрита на основании анализа крови: корреляция между результатами гистологического исследования желудка и уровнями гастрин-17 и пепсиногена I в сыворотке (Итоги многоцентрового исследования) // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. — 2003. — № 4. — С. 26–32.
2. Диагностика и терапия кислотозависимых заболеваний, в том числе и ассоциированных с *Helicobacter pylori*. Стандарты // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2005. — № 3. — С. 1–4.
3. Диагностика и лечение хеликобактерной инфекции: рекомендации третьей конференции Европейской группы по изучению *Helicobacter pylori*, 2005 // Клиническая фармакология и терапия. — 2006. — № 15 (1). — С. 32–35.
4. Маев И. В., Самсонов А. А. Современные стандарты лечения кислотозависимых заболеваний, ассоциированных с *H. pylori* (материалы консенсуса Маастрихт-3) // Consilium Medicum. — 2006. — Т. 8. — № 1.
5. Рекомендации по диагностике *Helicobacter pylori* у больных язвенной болезнью и методам их лечения // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 1998. — № 1. — С. 105–107.
6. Boren T., Falk P., Roth K. et al. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens // Science. — 1993. — Vol. 262. — P. 1892–1895.
7. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process // Cancer. Res. — 1992. — Vol. 52. — P. 6735–6740.
8. Harkonen M., Nikulin M., Sande N. et al. Atrophic corpus gastritis raises the level of homocysteine. — Atlanta, USA, 20–23 May 2001.
9. Laheij R., Oijen M., Paloheimo L. et al. Vitamin B12 deficiency and gastric functioning in patients with cardiovascular disease // Gut. — 2002. — № III. — Vol. 512.
10. Macchia G., Massone A., Burrone D. et al. The Hsp60 protein of *Helicobacter pylori*: Structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases // Mol. Microbiol. — 1993. — Vol. 9. — P. 645–652.
11. Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis // Lancet. — 1983. — N 1. — P. 1273–1275.
12. Samloff M. et al. Relationship among serum pepsinogen I, serum pepsinogen II and gastric mucosal histology. A study of relatives of patients with pernicious anemia // Gastroenterology. — 1975. — Vol. 69. — P. 1196–1200.
13. Samloff M. et al. A study of the relationship between serum group pepsinogen levels and gastric acid secretion // Gastroenterology. — 1982. — Vol. 83. — P. 204–209.
14. Sipponen P., Harkonen M., Alanko A. et al. Diagnosis of atrophic gastritis from serum samples // Clin. Lab. — 2002. — Vol. 48. — P. 505–515.
15. Talley N., Stanghellini V., Heading R. et al. Functional gastroduodenal disorders — Rome II: a multinational consensus document on functional gastrointestinal disorders // Gut. — 1999. — Vol. 45. — Suppl. 11. — P. 1137–1142.
16. Warren J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis // Lancet. — 1983. — N 1. — P. 1273.

ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ *HELICOBACTER PYLORI* ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИХЕЛИКОБАКТЕРНОЙ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ ПУТЕМ ДОПОЛНЕНИЯ СТАНДАРТНОГО ЭРАДИКАЦИОННОГО КУРСА САНАЦИЕЙ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

В. Ю. КРАВЦОВ*, Ю. А. ГРУХИН**, И. А. МИХАЙЛОВА*,
С. Н. ПРОШИН*, А. С. КОНДРАШИН*, М. Г. КОБИАШВИЛИ*, Н. Г. КУХИНА***

*Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России

**Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

***Dr. NONA International Ltd., Израиль

Резюме. Иммуноцитохимическим методом выявления *Helicobacter pylori* (HP) показано, что у пациентов, не достигших эрадикации после курса антихеликобактерной антибиотикотерапии, в ротовой полости сохраняются бактериальные клетки с антигенами HP. Нами проведено исследование HP в группе пациентов после проведения стандартного тройного курса антихеликобактерной антибиотикотерапии и в группе пациентов после такового, но усиленного процедурами санации ротовой полости. Полученные результаты указывают на возможность повышения эффективности антихеликобактерной антибиотикотерапии путем усиления стандартного эрадикационного курса сопутствующей санацией ротовой полости. Для обоснования назначения таких санаций может быть рекомендован иммуноцитохимический метод выявления HP, который позволяет визуализировать спиралевидные и, как правило, кокковые формы HP в зубном налете и в эпителии десен.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, эрадикация, иммуноцитохимия.

THE IMPORTANCE OF IMMUNOCYTOCHEMISTRY FOR INCREASING EFFICACY OF STANDARD ANTIHELICOBACTER THERAPY COMBINED WITH MOUTHCARE SOLUTION

V. YU. KRAVTSOV*, YU. A. GRUKHIN**, I. A. MIKHAILOVA*, S. N. PROSHIN*,
A. S. KONDRASHIN*, M. G. KOBIASHVILI*, N. G. KUKHINA***

*All-Russian Center for Emergency and Radiation Medicine named after A. M. Nikiforov,
Emercom of Russia, St. Petersburg

**Military Medical Academy named after S. M. Kirov, St. Petersburg

***Dr. NONA International Ltd., Izrael

Summary. It has been shown that insufficiency of eradication therapy are tightly related to preservation of *Helicobacter pylori* in mouth. The efficacy of therapy to eradicate *H. pylori* can be improved by combination of standard antihelicobacter therapy and treatment with mouthcare solution from DR. NONA. The result of combined therapy was checked by means of immunocytochemistry which had been found to be a very useful approach to verify spiral and coccoid forms not only in gastrobiopsies but also in mouth.

Key words: *Helicobacter pylori*, eradication therapy, immunocytochemistry.

Многочисленными исследованиями за последнее десятилетие доказана и общепризнана роль *Helicobacter pylori* (HP) в развитии заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки. У пациентов, инфицированных HP, рак желудка встречается в 4–6 раз чаще, чем у неинфицированных, а международное агентство по изучению рака (МАИР) признало достаточно доказательным отнести HP к канцерогенам первой группы [1, 8]. Широкое применение антихеликобактерной эрадикационной терапии привело к выдающимся успехам в лечении кислотозависимых заболеваний, а австралийским ученым Уоррену и Маршаллу за открытие патогенности HP в 2005 году была присуждена Нобелевская

премия. Стандартные схемы антихеликобактерной эрадикационной терапии регулярно регламентируются Маастрихтскими соглашениями, последнее из которых «Консенсус Маастрихт-3» состоялось в 2005 году [6]. Вместе с тем по данным различных авторов эрадикация HP достигает 60–80% (Маастрихт-3).

Бактериальные клетки HP обнаруживаются на протяжении всего желудочно-кишечного тракта, начиная с ротовой полости и заканчивая прямой кишкой, откуда они выходят в составе фекалий [9,10]. Возможно, что одной из причин неэффективности антихеликобактерной терапии является сохранение жизнеспособных бактериальных клеток HP в зубодесневых карманах, из

которых они могут реинфицировать слизистую оболочку желудка. Поэтому представляется практически важным в целях достижения эрадикации НР стандартный эрадикационный курс усилить процедурами санации ротовой полости.

Бактериальные клетки НР в ротовой полости можно визуализировать с помощью специфических к клеточной стенке НР антител [10]. На этом принципе основан иммуноцитохимический метод, который применим в клинико-лабораторной практике, и с помощью которого можно выявлять и спиралевидные, и кокковые формы НР [5, 7]. В результате в цитологическом препарате после проведенной иммуноцитохимической реакции характерное окрашивание будут иметь только те бактериальные клетки, в том числе и кокки, которые имеют антигены, специфичные для НР.

В связи со всем вышесказанным целью нашего исследования стало изучение НР иммуноцитохимическим методом в группе пациентов после проведения стандартного тройного курса антихеликобактерной антибиотикотерапии и в группе пациентов после такового, но усиленного процедурами санации ротовой полости. Особенностью настоящего исследования стало то, что иммуноцитохимические исследования НР проводились не только традиционно в гастробиоптатах, но и в материале из ротовой полости.

Клиническая характеристика больных и методы исследования

Клиническая характеристика больных и схемы антихеликобактерной антибиотикотерапии. Для выполнения исследования изначально был использован целенаправленный отбор больных, проходивших лечение в клинике ВЦРЭМ им. А. М. Никитина МЧС России в период с 2000–2003 гг. Осуществлено обследование 572 пациентов с различными вариантами течения хронического гастрита.

Иммуноцитохимическим методом проведено 730 исследований больным с хроническим гастритом. Из общего числа обследованных пациентов с хроническим гастритом *H. pylori* не был выявлен у 188 больных (32,8%). Хронический НР-ассоциированный гастрит был выявлен у 384 пациентов (67%). В соответствии с данными гистологического анализа СОЖ (классификациями вариантов нормы [3, 4]) и ее патогистологическими изменениями), а также с учетом данных модифицированной Сиднейской классификации хронического гастрита [2], основную часть составили пациенты с хроническим атрофическим НР-ассоциированным гастритом (44,2%). Хронический неатрофический НР-ассоциированный гастрит наблюдался у 35,6%; хронический НР-ассоциированный гастрит с кишечной метаплазией слизистой оболочки желудка — у 20,2% больных.

Исследования эффективности антихеликобактерной антибиотикотерапии проводились в двух группах пациентов, сформированных из общего числа обследованных (572 человека). Группу 1 составили 54 человека (32 мужчины и 22 женщины в возрасте от 35 до 65 лет) с диагнозом хронический НР-ассоциированный атрофический гастрит. Все пациенты этой группы прошли стандартный курс эрадикационной терапии продолжительностью 7 дней по следующей схеме: кларитромицин по 500 мг 2 раза в день, амоксициллин по 500 мг 4 раза в день, омепразол по 20 мг 2 раза в день.

Группу 2 составили 34 человека (27 мужчин и 7 женщин в возрасте от 20 до 43 лет) с тем же диагнозом хронический НР-ассоциированный атрофический гастрит. Пациенты группы 2 также прошли стандартный курс эрадикационной терапии (кларитромицин по 500 мг 2 раза в день, амоксициллин по 500 мг 4 раза в день, омепразол по 20 мг 2 раза в день). Вместе с тем пациентам группы 2 в отличие от пациентов группы 1 было назначено полоскание средством ухода за полостью рта «Dr. NONA» в разведении 1:1 два раза в день утром и вечером с полосканием и последующим проглатыванием препарата внутрь с массажем десен. Продолжительность курса полоскания составляла 2 недели. Важно подчеркнуть, что больные перед курсом лечения меняли зубные щетки, а на протяжении всего курса подвергали их обработке (кипячением) после каждого пользования.

Через 1–2 месяца после лечения пациентам была проведена повторная фиброгастроуденоскопия с забором биопсийного материала из антрального отдела и в некоторых случаях из тела желудка.

Инструментальный метод исследования (фиброэзофагогастроуденоскопия). Метод инструментальной диагностики включал обязательное выполнение эзофагогастроуденофиброскопии с одновременной биопсией слизистой оболочки желудка. Эндоскопическое исследование выполнялось по общепринятой методике, в процессе которого оценивалось состояние слизистой оболочки — степень выраженности воспаления (гиперемия, отек, подслизистые кровоизлияния и эрозии (острые или хронические), гиперплазия складок, повышенная ранимость), наличие атрофических изменений гастродуоденальной слизистой оболочки (бледность, сглаженность, истончение, мозаичность слизистой в теле и антральном отделе, просвечивание сосудов). Прицельная биопсия проводилась из антрального отдела желудка. Биопсийный материал слизистой оболочки желудка был использован для проведения гистологических и иммуноцитохимических исследований.

Иммуноцитохимический метод. Биоптаты СОЖ, полученные при выполнении фиброэзофагогастроуденоскопии с прицельной биопсией, отпечатывали на обезжиренные предметные стекла тонким слоем. Для

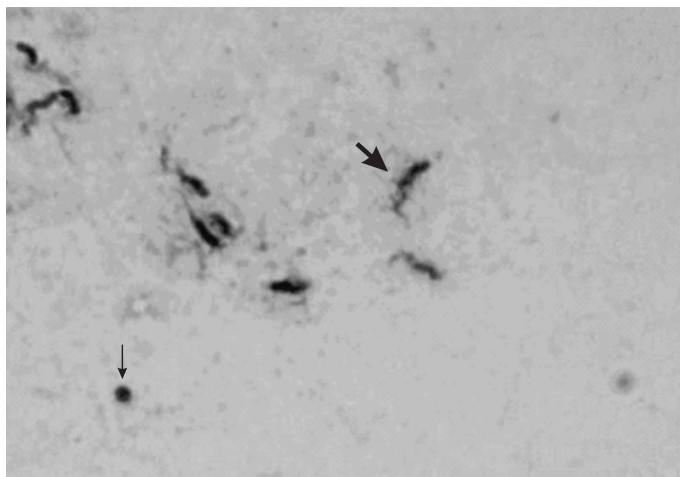


Рис. 1. Бактериальные клетки спиралевидных (отмечены большой стрелкой) и кокковой (отмечена маленькой стрелкой) форм *Helicobacter pylori*, выявленные иммуноцитохимическим методом, в биоптате слизистой оболочки желудка. Увеличение $\times 1000$

исследований НР из ротовой полости соскобы с поверхности зубодесневой борозды с помощью стерильной одноразовой щетки для браш-биопсий также наносили на обезжиренные предметные стекла тонким слоем. Полученные таким образом цитологические мазки, фиксированные смесью спирт : ацетон в соотношении 1 : 1 в течение 10 мин., высушивали на воздухе и инактивировали эндогенную пероксидазу в 1%-м азиде натрия (Merck) в течение 30 мин. Промывали в двух сменах бидистиллированной воды и оставляли на 5 мин. в Трис-NaCl буфере (pH 7,6). До нанесения преиммунной свиной сыворотки (Novocastra) поле для иммуноцитохимического анализа ограничивали гидрофобным карандашом (DakoCytomation). По окончании инкубации с преиммунной сывороткой (30 мин. при комнатной температуре) наносили поликлональные кроличьи антитела (NCL-NRр, Novocastra), направленные против антигенов клеточной стенки *Helicobacter pylori*, и инкубировали препараты в течение часа при $+37^{\circ}\text{C}$. По завершении мечения первыми антителами препараты проводили в двух сменах буфера по 5 мин. и наносили свиные биотинилированные антитела (DakoCytomation), направленные против кроличьих антител. Со вторыми антителами препараты инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре. Следующим этапом иммуноцитохимической процедуры, которому предшествовала отмывка препаратов в двух сменах буфера, являлось нанесение на 30 мин. при комнатной температуре системы визуализации, состоящей из растворимого комплекса — авидин и биотинилированная пероксидаза хрена (DakoCytomation). В качестве субстрата для проявления иммуноцитохимической реакции использовали 3,3'-diaminobenzidine (ДАБ) в формате от фирмы Novocastra. Для контрастирования препараты подкрашивали с использованием красителя ЦитоСтейн-ГК

(Диахим, Абрис). Следует отметить, что при использовании в качестве первых антител поликлональных кроличьих от фирмы DacoCytomation результат иммуноцитохимической верификации хеликобактерной инфекции полностью соответствовал результату, когда вариантом первых антител являлись поликлональные кроличьи от фирмы Novocastra.

Анализ препаратов проводили под иммерсией на микроскопе Leica DM 4000.

Результаты и обсуждение

В мазках-отпечатках, полученных из гастробиоптатов СОЖ и окрашенных иммуноцитохимическим методом с проявкой диаминобензидином (ДАБ), бактериальные клетки НР имели цвета от темно-коричневого до насыщенного черного (рис. 1). Размеры спиралевидных форм бактериальных клеток НР варьировали от 3–5 мкм в длину и составляли около 0,5 мкм в поперечнике. Кокковые формы НР в абсолютном большинстве случаев имели размеры от 0,5 до 1 мкм в диаметре и идеально округлую форму. Иногда, наряду с бактериальными клетками НР, которые были окрашены в коричнево-черный цвет ДАБом, были видимы бактериальные клетки (бациллы, палочки, диплококки и пр.), которые окрашивались в светлые серо-розовые тона гематоксилином.

Результаты иммуноцитохимического исследования бактериальных клеток НР в группе 1, прошедших курс эрадикационной терапии, оказались следующими. У большинства (40 человек, 74,1%) бактериальные клетки НР и спиралевидных, и кокковых форм выявлены не были. Спиралевидные формы и кокковые формы НР наблюдались у 10 пациентов (18,5%). И, наконец, у 4 из 54 пациентов (7,4%) были обнаружены только кокковые формы НР.

Важно отметить, что двое из четырех пациентов, у которых при контроле эрадикации иммуноцитохимическим методом были обнаружены только кокковые формы НР, вновь обратились в клинику с жалобами через 4 (первый пациент) и 6 (второй пациент) месяцев. После этого при очередном (уже третьем) иммуноцитохимическом обследовании у них вновь были обнаружены и спиралевидные, и кокковые формы НР (с количественной оценкой «+++»).

По результатам иммуноцитохимического исследования бактериальных клеток НР в СОЖ у пациентов после эрадикации можно утверждать, что полностью эффективная эрадикация НР, проводимая по стандартному курсу, достигается в 74,1% случаев, когда в СОЖ не выявляются ни спиралевидные, ни кокковые формы НР.

Важным выводом, который следует сделать, основываясь на результатах исследования, является то, что в 7,4% случаев в СОЖ пациентов, прошедших курс лечения, остаются кокковые формы НР, в то время как спиралевидные формы НР не обнаруживаются. Если бы в исследованной группе пациентов контроль эрадикации оценивался морфологическим методом, в котором учитываются только спиралевидные формы («золотым стандартом»), то эти 7,4% случаев в реальности следовало бы рассматривать как псевдоэффективную эрадикацию.

У десяти пациентов, прошедших стандартный курс тройной антихеликобактерной антибиотикотерапии, но не достигших эрадикации НР, мы исследовали соскобы с зубодесневой борозды на предмет присутствия бактериальных клеток НР иммуноцитохимическим методом. Оказалось, что у всех были обнаружены бактериальные клетки с антигенами НР. По результатам иммуноцитохимического исследования НР в материале из полости рта сразу стоит отметить, что в этом исследовании мы не обнаружили такой обильной обсемененности бактериальными клетками с антигенами НР, как в СОЖ гастробиоптатов. В каждом исследуемом образце (цитологическом препарате) из ротовой полости мы просматривали по 200–300 полей зрения. Положительный результат инфицирования бактериальными клетками НР регистрировался, если при этом обнаруживалось не менее 5 бактериальных клеток с видоспецифичными антигенами НР. Бактериальные клетки, позитивные по антигенам НР в ротовой полости, при использовании в качестве субстрата ДАБ проявлялись, как и в СОЖ, темно-коричневым цветом с четкими контурами. В подавляющем большинстве случаев в исследованных образцах из ротовой полости бактериальные клетки с антигенами НР выглядели, как кокки (рис. 2а), и только в двух случаях нам удалось увидеть НР антиген-позитивные бактерии, спиралевидных форм (рис. 2б). Как правило, бактериальные клетки с антигенами НР находились в ассоциациях с микрофлорой, внешне схожей с актиномицетами и кандидой, а также с эпителиоцитами. Тем не менее результаты иммуноцитохимического ис-

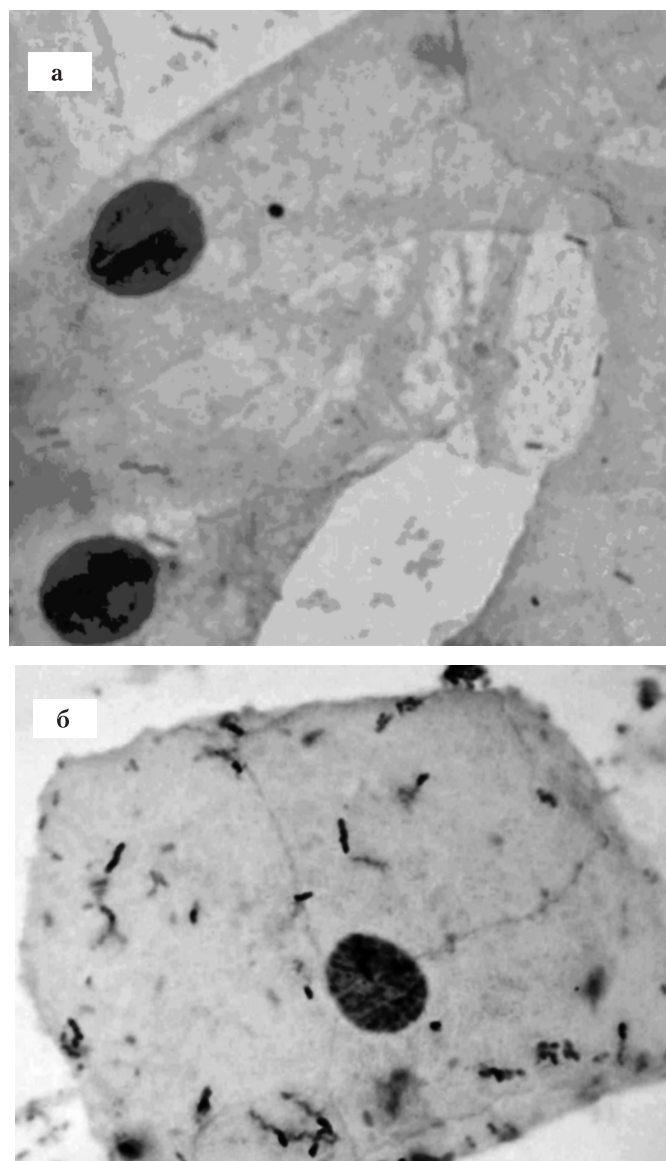


Рис. 2. Бактериальные клетки с антигенами *Helicobacter pylori* кокковой формы (а) и преимущественно спиралевидных форм (б), выявленные иммуноцитохимическим методом, в соскобе с поверхности зубодесневой борозды.
Увеличение $\times 1000$

следования НР в ротовой полости пациентов, прошедших курс антихеликобактерной антибиотикотерапии, но не достигших эрадикации НР (по данным контроля эрадикации в гастробиоптатах), позволяют аргументировать факт, что они имели инфицирование НР в ротовой полости. Возможно, что последнее обстоятельство привело к реинфицированию бактериальными клетками НР СОЖ антрального отдела желудка.

Теперь рассмотрим результаты антихеликобактерной антибиотикотерапии у пациентов группы 2, которые наряду с приемом препаратов по тройной стандартной схеме параллельно проводили полоскание ротовой полости средством ухода за полостью рта «Dr. NONA».

Важно отметить, что все пациенты группы 2 до назначения эрадикации были обследованы также на предмет НР в соскобах с зубодесневой борозды и оказались НР позитивными по этому анализу, как и по данным иммуноцитохимического исследования НР в СОЖ.

Оказалось, что в гастробиоптатах СОЖ у 32 пациентов из 34 (94,1%) бактериальные клетки НР и спиралевидных, и кокковых форм выявлены не были, и только лишь у 2 пациентов из 34 (5,9%) были обнаружены кокковые формы.

Таким образом, в группе 1 (n=54) эрадикация НР достигалась в 74,1% случаев, а в группе 2 (n=34) — в 94,1% случаев. Этот результат, на наш взгляд, позволяет сделать заключение о том, что повышения эффективности антихеликобактерной антибиотикотерапии можно добиться путем усиления стандартного эрадикационного курса санацией ротовой полости. Для этого в курсе эрадикационной антихеликобактерной терапии средство для полоскания полости рта «Dr. NONA» было выбрано нами по следующим причинам. В его ингредиенты входят биоорганоминеральный комплекс Мертвого моря, включающий производные архебактерий и соли, а также эссенции масел ромашки, тимьяна, лимона, шалфея и мяты. Активные субстраты, выделенные из архебактерий, являются антиоксидантами, а также выступают как иммуностимуляторы и, возможно, препятствуют жизнедеятельности условно патогенной и патогенной микрофлоры. Гигиеническая сертификация средств гигиены полости рта «Dr. NONA» утверждена 21.12.93 Государственным Комитетом санитарного и эпидемиологического контроля Российской Федерации. Следует отметить, что для санации ротовой полости в ходе эрадикационной терапии, вероятно, могут применяться и другие средства, также содержащие растительные или иные экстракты и даже антибиотики.

Таким образом, результаты представленного исследования указывают на то, что повышения эффективности антихеликобактерной антибиотикотерапии можно добиться путем усиления стандартного эрадикационного курса сопутствующей санацией ротовой полости. Для обоснования назначения таких санаций может быть рекомендован иммуноцитохимический метод выявления НР, который позволяет визуализировать спиралевидные и, как правило, кокковые формы НР в зубном налете и в эпителии десен.

Литература

1. Аруин Л. И. Инфекция *Helicobacter pylori* канцерогенна для человека // Архив патологии. — 1997. — № 3. — С. 74–78.
2. Аруин Л. И. Новая международная морфологическая классификация гастрита (Модификация Сиднейской системы) // Арх. пат. — 1997. — № 3. — С. 3–7.
3. Аруин Л. И. *Helicobacter pylori* в этиологии и патогенезе язвенной болезни. — Материалы 7-й сессии Российской группы по изучению *Helicobacter pylori*. — 1998. — Нижний Новгород. — С. 6–11.

4. Аруин Л. И., Капуллер Л. Л., Исаков В. А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. — М.: Триада, 1998. — 483 с.
5. Кравцов В. Ю., Никифоров А. М., Прошин С. Н., Кондрашин А. С., Кобиашвили М. Г., Михайлова И. А. Иммуноцитохимическое исследование кокковых форм *Helicobacter pylori* в биоптатах слизистой оболочки желудка у больных хроническим гастритом // Клини. лабор. диагностика. — 2006. — Том. 3. — С. 52–54.
6. Шепетулин А. А., Киприанис В. А. Диагностика и лечение инфекции *Helicobacter pylori*: основные положения согласительного совещания «Маастрихт-3» // РЖГГК, 2006, № 2. — С. 88–91.
7. Jakic-Razumovic J., Tentor D., Kusec V., Cuzic S., Brkic T. Histopathological features of gastritis before and after treatment for *Helicobacter pylori* // Croat. Med. J. — 2000. — Vol. 41, N 2. — P. 159–62.
8. JARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1994. Vol. 61: Schistosomes, Liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, France, International agency for research on cancer: 177–240.
9. Perri F., Manes G., Neri M., Vaira D., Nardone G. *Helicobacter pylori* antigen stool test and 13C-urea breath test in patients after eradication treatments // Am. J. Gastroenterol. — 2002. — Vol. 97, N 11. — P. 2756–62.
10. Yong K. A., Allaker R. P., Hardie J. M. Morphological analysis of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies and dental plaque by scanning electron microscopy // Oral Microbiol. Immunol. — 2001. — Vol. 16, N 3. — P. 178–81.



BIOHIT
Innovating for Health

**«ГастроПанель» —
безопасная диагностика при:**



- диспепсии
- атрофическом гастрите
- инфекции *Helicobacter pylori*
- рисках развития
рака желудка,
язвенной болезни,
ГЭРБ, дефицита
витамина B12, железа
и кальция, связанных
с атрофическим гастритом



ООО «БИОХИТ»
199048, Санкт-Петербург,
6-я линия В.О., д.57
тел.: (812) 327-53-27
факс: (812) 327-53-23
e-mail: main@biohit.ru

Филиал в Москве
127287, Петровско-Разумовский пр-д,
д.29 стр.2
тел: (495) 748-16-13
факс: (495) 613-55-17
e-mail: main.moscow@biohit.ru



www.biohit.ru, www.gastropanel.ru

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЛАПАРОСКОПИЯ В СОВРЕМЕННОЙ ЭКСТРЕННОЙ АБДОМИНАЛЬНОЙ ХИРУРГИИ И ЛЕЧЕНИИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ

Д. Ю. СЕМЕНОВ, Р. В. ЧЕМИНАВА, Е. Н. СМОЛИНА, И. А. СТЕПНОВ

ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Росздрава, кафедра общей хирургии

Резюме. Статья дает возможность по-новому посмотреть на диагностику и лечение различных хирургических заболеваний органов брюшной полости. В статье приведен перечень заболеваний и осложнений после операции, которые могут быть диагностированы с помощью лапароскопии. Уделено внимание тому, что нельзя использовать видеолaparоскопию, несмотря на все ее преимущества, как основной способ диагностики, без применения методов ультразвуковой, лучевой диагностики, а также фиброгастродуоденоскопии. В выводах, представленных в конце статьи, указаны основные преимущества данного метода диагностики острых хирургических заболеваний брюшной полости и послеоперационных осложнений.

Ключевые слова: диагностическая лапароскопия.

DIAGNOSTIC LAPAROSCOPY IN MODERN EMERGENCY ABDOMINAL SURGERY AND TREATMENT OF POST-OPERATION COMPLICATIONS

D. JU. SEMENOV, R. V. CHEMINAVA, E. N. SMOLINA, I. A. STEPNOV

State Educational Institution of Higher Professional Education «Saint-Petersburg I. P. Pavlov State Medical University», Federal Agency for Health Care and Social Development, General Surgery Department

Summary. The article gives a new concept of diagnosis and treatment of different surgical diseases of abdominal cavity. A number of diseases and postoperational complications are given, in which diagnostic laparoscopy can be effective. In spite of all positive features of videolaparoscopy, it can not be used as a main diagnostic method, without the use of other methods (ultrasonography, radiography, fibrogastroduodenoscopy). The conclusions concern the main positive features and role of the method in diagnosis of acute surgical diseases of abdominal cavity and postoperational complications.

Key words: diagnostic laparoscopy.

Появление в хирургии видеолaparоскопии дало возможность по-новому посмотреть на диагностику и лечение многих хирургических заболеваний. Визуальная оценка патологических изменений в брюшной полости позволяет не только более точно поставить диагноз [1, 3, 5], но и определить дальнейшую тактику лечения больного [3]. Минимальная травматичность и высокая информативность делают диагностическую лапароскопию в настоящее время чрезвычайно привлекательным методом. Некоторые авторы даже рекомендуют ее как первый диагностический этап, не учитывая возможности неинвазивных методов диагностики [4]. Однако мы считаем, что диагностическая лапароскопия не должна исключать существующих современных методов диагностики. Она может выполняться как последний этап в диагностическом алгоритме, если такие современные методы, как фиброгастродуоденоскопия, ультразвуковое и лучевые методы исследования не позволяют быстро и точно поставить диагноз.

Цель данной работы заключалась в определении возможностей и оценке результатов диагностической лапароскопии в экстренной абдоминальной хирургии и лечении послеоперационных осложнений.

Материалы и методы. Проанализированы результаты обследования и лечения в двух группах больных.

Первая группа была выделена из 4144 пациентов, госпитализированных в клинику общей хирургии в ургентном порядке за последние пять лет. Существовала возможность всем больным помимо стандартных клиничко-лабораторных исследований в любое время суток выполнить по показаниям ультразвуковое исследование и фиброгастродуоденоскопию. В результате 840 пациентам были выставлены показания к экстренному оперативному вмешательству. Из них 90 пациентам, составившим I группу, для уточнения диагноза и выбора оптимальной тактики дальнейшего лечения потребовалось выполнение диагностической лапароскопии.

Для оценки возможностей лапароскопии в лечении послеоперационных осложнений были проанализированы результаты 5593 плановых и экстренных операций на органах брюшной полости. Осложнения, потребовавшие экстренного оперативного вмешательства, возникли у 63 больных (1,1%). II группу составили 26 пациентов, у которых оперативное вмешательство было начато с диагностической лапароскопии.

Результаты и обсуждение. В первой группе из 90 оперированных пациентов в 89 случаях (98,8%) диагностическая лапароскопия выявила заболевание, объясняющее болевой и интоксикационный синдром. Из них

в 6 случаях (6,6%) лапароскопическая диагностика исключила наличие острого заболевания, требующего хирургического вмешательства. У 84 пациентов (93,4%) подтвердились наши подозрения о наличии острого хирургического заболевания органов брюшной полости. При этом совпадение пред- и послеоперационного диагнозов было у 54 больных (60%).

Основным предварительным диагнозом, по поводу которого выполнялась диагностическая лапароскопия, был острый аппендицит (48 пациентов). Из них у 32 пациентов (66,6%) диагноз был подтвержден, у 11 больных (22,9%) были выявлены острые гинекологические заболевания, в 3 (6,2%) случаях установлен диагноз мезаденита. У 2 больных диагностированы крайне редко встречающиеся заболевания: висцеральный туберкулез и перфорация дивертикула Меккеля.

Несоответствие клинической картины острого холецистита и данных ультразвукового исследования явилось показанием к выполнению диагностической лапароскопии у 8 больных. В 75% случаев (6 больных) диагноз был подтвержден. У одного больного картину острого холецистита симулировал острый оментит, у другого обнаружен рак тела матки, конгломерат лимфоузлов в подпеченочном пространстве, канцероматоз брюшины и асцит.

При предварительном диагнозе острого панкреатита диагностическая лапароскопия выполнялась 9 больным при перитонеальном синдроме и наличии, по данным УЗИ, жидкости в животе. Задача диагностики состояла в оценке выраженности деструктивных процессов и выполнении дренирующей операции. У 4 больных диагноз был подтвержден (44,4%). У двух больных (22,2%) диагностирован гангренозный аппендицит, разлитой перитонит, и по одному случаю (11,1%) — канцероматоз брюшины и асцит-перитонит, пельвиоперитонит и болезнь Крона.

При предоперационном диагнозе острой кишечной непроходимости диагностическая лапароскопия выполнялась у 9 больных с целью установления причины и возможности ее устранения с помощью лапароскопической техники. У 5 больных была выявлена спаечная кишечная непроходимость (55,5%), у троих больных (33,3%) симптомы кишечной непроходимости были обусловлены тромбозом мезентериальных сосудов, а у 1 больного — болезнью Крона.

Диагностическая лапароскопия при подозрении на перфоративную язву выполнялась при отсутствии на рентгенограммах газа в брюшной полости, наличии дуоденальной язвы, по данным ФГДС, и перитонеальных симптомов у 6 больных. Во всех случаях была диагностирована прикрытая перфорация дуоденальной язвы.

При неясной клинической картине и наличии у больного симптомов перитонита диагностическая лапароскопия выполнялась 10 больным для выявления его причины и выбора доступа к патологическому очагу при выполнении традиционного вмешательства. У 2 больных

причиной развития перитонита были острый холецистит, острый аппендицит, канцероматоз брюшины, по 2 случая соответственно, и по одному — перфорация дивертикула сигмовидной кишки, пельвиоперитонит и нарушенная внематочная беременность. У одной больной причиной перитонеальной симптоматики был острый мезаденит.

Результаты диагностической лапароскопии служили основанием для выбора дальнейшего метода лечения больных. При выявлении заболевания, требующего экстренной операции, выполнялось три вида вмешательств: традиционная операция, эндовидеохирургическая операция и сочетанное использование этих методов, под которым мы подразумеваем лапароскопическую санацию и дренирование различных отделов брюшной полости и малый по объему оперативный доступ для выполнения оперативного приема.

Выбор метода оперативного вмешательства определялся следующими факторами:

- во-первых, поставленным диагнозом;
- во-вторых, возможностями эндовидеохирургических технологий в лечении выявленного заболевания. Выраженный спаечный процесс, раздутые петли кишечника могут не позволить адекватно выполнить не только ревизию и санацию брюшной полости, но и сам оперативный прием;
- в-третьих, наличие противопоказаний к наложению длительного напряженного пневмоперитонеума в некоторых случаях является причиной выполнения лапаротомии;
- в-четвертых, необходимо учитывать опыт оперирующего хирурга, и ни в коем случае не стараться выполнить операцию лапароскопически «во что бы то ни стало».

При исключении заболевания, не требующего дальнейшего хирургического вмешательства, больные получали консервативное лечение в условиях хирургического отделения.

В хирургическом лечении острого аппендицита мы не противопоставляем традиционный и лапароскопический методы. По результатам диагностики у 8 больных выявлен острый флегмонозный аппендицит, червеобразный отросток свободно располагался в брюшной полости. Им выполнена лапароскопическая аппендэктомия. У 8 больных с гангренозным аппендицитом и разлитым перитонитом выполнено комбинированное вмешательство. Сначала лапароскопически была произведена санация брюшной полости, а также установлены дренажи по фланкам и в малый таз, а затем из лапаротомного доступа выполнена аппендэктомия. Традиционным методом выполнена аппендэктомия 20 больным с гангренозным аппендицитом, местным перитонитом, причем оптимальный доступ к червеобразному отростку был определен при выполнении лапароскопии.

По поводу острого холецистита 6 больным была выполнена лапароскопическая холецистэктомия, 2 боль-

ным с гангренозным холециститом, разлитым перитонитом — традиционное вмешательство.

Санационно-дренирующие операции при остром панкреатите в 2 случаях выполнены лапароскопически, и у 2 больных была выполнена лапаротомия из-за невозможности полноценной ревизии и санации брюшной полости в связи с выраженным спаечным процессом.

Перфорация язвы луковицы двенадцатиперстной кишки в 4 случаях ушита по принятой в клинике лапароскопической методике. У 2 больных традиционное вмешательство выполнено из-за технических сложностей, вызванных раздутыми после фиброгастроуденоскопии петлями тонкой кишки.

В 4 случаях кишечная непроходимость была ликвидирована рассечением спаек при лапароскопическом вмешательстве. Открытая операция потребовалась в 1 случае для ликвидации заворота сигмовидной кишки.

У 14 пациенток диагностированы острые гинекологические заболевания, требующие хирургического вмешательства, которое было выполнено лапароскопическим методом. При нарушенной внематочной беременности выполнялась тубэктомия, при апоплексии яичника — клиновидная резекция яичника, при пельвиоперитоните — санация брюшной полости и дренирование малого таза.

У 3 пациентов выявлен тромбоз мезентеральных сосудов, потребовалась лапаротомия для оценки его распространенности и определения дальнейшей лечебной тактики. При перфорации Меккелева дивертикула резекция тонкой кишки и санация брюшной полости выполнены традиционным способом.

Микроперфорация дивертикула сигмовидной кишки ушита лапароскопически двухрядным атравматическим швом с санацией и дренированием брюшной полости.

Поставленные диагнозы канцероматоз с асцит-перитонитом и висцеральный туберкулез потребовали интраоперационной биопсии и санации и дренирования брюшной полости. Подтвержденный диагноз висцерального туберкулеза позволил в дальнейшем провести курс патогенетической терапии с удовлетворительным результатом.

При диагностике острого мезаденита и болезни Крона дополнительные хирургические манипуляции не выполнялись.

Из 90 пациентов, которым были поставлены показания к выполнению диагностической лапароскопии, лишь в одном случае допущена ошибка (1,1%) — не был распознан острый аппендицит. Причина ее состояла в том, что оперирующий хирург не мобилизовал слепую кишку для визуализации ретроперитонеально расположенного червеобразного отростка. Был ошибочно поставлен диагноз острого мезаденита. Больной был оперирован через 7 суток по поводу гангренозного ретроперитоне-

ального аппендицита, флегмоны забрюшинного пространства.

При выполнении лапароскопических и традиционных вмешательств интра- и послеоперационных осложнений не было. Комбинированное использование двух методов позволило избежать широких лапаротомий для санации брюшной полости и использовать оптимальный доступ для выполнения традиционной операции.

Летальность в данной группе больных составила 3,3%. После традиционных вмешательств погибли 3 больных с тотальным мезентериальным тромбозом.

Во второй группе самой частой причиной выполнения лапароскопии явилось истечение крови по контрольному дренажу. Эту группу составили 14 человек (53,8%). В 11 случаях кровоточили сосуды ложа желчного пузыря, в 2 случаях кровь поступала в брюшную полость из троакарной раны. У одной больной после выполнения сочетанной операции: лапароскопической холецистэктомии и надвлагалищной ампутации матки, при лапароскопии диагностировано кровотечение из правой яичниковой артерии из-за соскочившей лигатуры. Выполнена релапаротомия, артерия лигирована.

На втором месте среди причин, потребовавших повторной операции, было желчеистечение по дренажу. Диагностическая лапароскопия выполнена 6 пациентам (23,1%). После выполнения лапароскопической холецистэктомии: у двоих причиной явилась соскочившая клипса с пузырного протока, еще у двоих — желчеистечение из ходов Люшка. У 1 больного после открытой холецистэктомии выявлено желчеистечение из ложа желчного пузыря, и у 1 больной желчь в брюшную полость поступала из поврежденного желчного пузыря после лапароскопической эпинефрэктомии. Выполнена лапароскопическая холецистэктомия.

У 3 больных (11,5%) после открытых операций (в одном случае — резекция 2/3 желудка и в двух — левосторонняя гемиколонэктомия) для определения возможности ликвидации ранней спаечной кишечной непроходимости была выполнена диагностическая лапароскопия. В двух случаях спайки рассечены лапароскопически, в одном у больного после резекции желудка для ликвидации непроходимости потребовалась релапаротомия.

У 2 больных (7,7%) после лапароскопического ушивания перфоративной язвы возникла клиника прогрессирующего перитонита, что явилось показанием для диагностической лапароскопии. В обоих случаях для санации брюшной полости и ушивания несостоятельности эндошва потребовалась лапаротомия.

У 1 больного (3,84%) показанием к лапароскопии было развитие перитонеальных симптомов после попытки наложения пункционной эпицистостомы при острой задержке мочи. На операции визуализирована колотая рана мочевого пузыря, которая была ушита лапароскопически.

Из всех осложнений оперативных вмешательств завершить операцию с помощью лапароскопической методики удалось у 22 больных (84,6%). И только 4 пациентам после лапароскопии и постановки диагноза потребовалось лапаротомия. Летальности в данной группе больных не было.

Выводы

1. Диагностическая лапароскопия является последним этапом в диагностическом алгоритме при обследовании больных с острыми хирургическими заболеваниями органов брюшной полости.

2. Применение диагностической лапароскопии позволяет определить дальнейшую тактику лечения, а также выбрать оптимальный метод хирургического вмешательства у больных с острыми хирургическими заболеваниями органов брюшной полости.

3. Диагностическая лапароскопия также является высокоэффективным малоинвазивным методом, позво-

ляющим в большинстве случаев определить и устранить причину развития послеоперационных осложнений, развившихся после операций на брюшной полости.

Литература

1. Касумян С. А., Некрасов А. Ю., Покусаев Б. А. и др. Лапароскопия в ургентной абдоминальной хирургии // Вестник Смоленской медицинской академии. — 2003. — № 1. — С. 14–18.
2. Кригер А. Г., Череватенко А. М., Фаллер Э. Р. Лапароскопическое лечение острого аппендицита // Эндоскопическая хирургия. — 1995. — № 2–3. — С. 34–36.
3. Балалыкин А. С. Эндоскопическая абдоминальная хирургия. — М., 1996. — С. 125–130.
4. Чиж И. А. Возможности видеолaparоскопии при «остром животе» в городском стационаре. — Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — СПб., 2001. — 20 с.
5. Ллойд М. Найхус, Джозеф М. Вителло, Роберт Э. Конден. Боль в животе. Руководство по неотложной диагностике заболеваний органов брюшной полости. — Москва. Изд-во БИНОМ. 2000. — 236 с.

ООО «БИНАЛИТИКА»

190000, САНКТ-ПЕТЕРБУРГ, ВОХ 1234, ТЕЛ.: (812) 322-52-84

НОВЫЙ ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР «БИЛАБ-100»



- методики анализа: конечная точка, кинетика, фиксированное время, нелинейная калибровка;
- интерференционные светофильтры 340, 405, 505, 546, 578, 630 нм;
- расход реагентов на один анализ 0,20–1,0 мл;
- программа контроля качества; • проточная кювета 32 мкл;
- встроенный матричный принтер; • программа подключения к ПК;
- термостат на элементе Пельтье; • цена от 60 000 рублей

• альбумин • общий белок • креатинин • триглицериды • глюкоза • АЛТ • АСТ
• ЛДГ • билирубин • мочеви́на • α -амилаза • кислая и щелочная фосфатаза
• холестерин • креатинкиназа • Ca • Fe • P • Cl • Mg • Zn • Cu и т. д.

ФЛУОРИМЕТР, ФОТОМЕТР, ХЕМИЛЮМИНОМЕТР

«ФЛЮОРАТ-02-АБЛФ-Т»



- ксеноновая лампа с длительным сроком службы;
- спектральный диапазон 270–850 нм;
- методики анализа: конечная точка, кинетика, фиксированное время;
- термостат измерительной кюветы 25, 30, 37° С;
- спектральная селекция длин волн — светофильтры;
- память на 100 методик анализа;
- программа передачи данных на ПК

• адреналин • норадреналин • витамины А, Е, В1, В2, В6 • гистамин
• серотонин • порфирины • общий белок • креатинин • триглицериды
• АТФ • глюкоза • 17-КС • 11-ОКС • 17-ОКС • субстраты
• ферменты • Fe • Ca • Na • K • P • Cl • Zn • Cu



197046 Санкт-Петербург Петровская наб., дом 4
тел.: +7 (812) 703 43 49 | 380 92 03 | 232 29 77
факс: +7 (812) 230 65 23 www.corway.ru

Администрация ООО «КОРВЭЙ» благодарит редакцию журнала «Клинико-Лабораторный Консилиум» за вновь предоставленную возможность продолжить знакомство читателей с нашей компанией.

Вакуумные системы для взятия венозной крови **“Improvacuter LindVac”** уже прочно занимают свое место на российском рынке. Оптимальное соотношение цены и качества делает крайне привлекательной данную продукцию для широкого круга лечебных учреждений на всей территории России.

ООО «КОРВЭЙ» продолжает расширять круг потребителей вакуумных систем, и с сентября 2007 года мы рады представить новую продукцию, произведенную крупнейшим китайским производителем Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd. Потребность насытить рынок недорогим (и соответственно более доступным для больниц и поликлиник) аналогом микроветт и миниколетт заставила ООО «КОРВЭЙ» вывести новинку — микропробирки для взятия капиллярной крови, получившие название **“LindVac mini” (“Impromini”)**.

Отвечающая всем современным требованиям, предъявляемым к взятию капиллярной крови, данная продукция не может не заинтересовать широкий круг лечебных учреждений.

На данный момент выпускаются 7 основных типов **“LindVac mini”** по видам наполнителей-антикоагулянтов:

- для гематологических исследований — с K2 и K3 ЭДТА;
- для исследований сыворотки — с активатором свертывания и активатор свертывания + гель;
- для исследования плазмы крови — с литий-гепарином и натрий-гепарином;
- для исследования сахара крови — с флюоридом натрия/оксалатом калия;

и 2 типа по размеру — на 200 мкл и на 500 мкл.

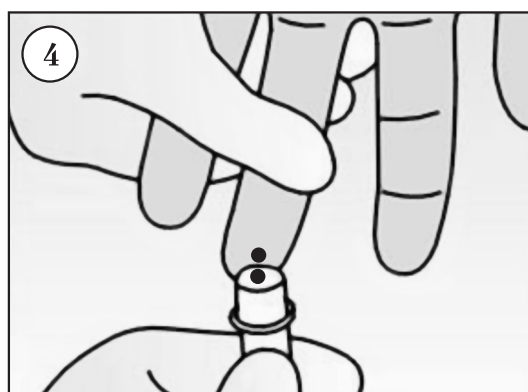
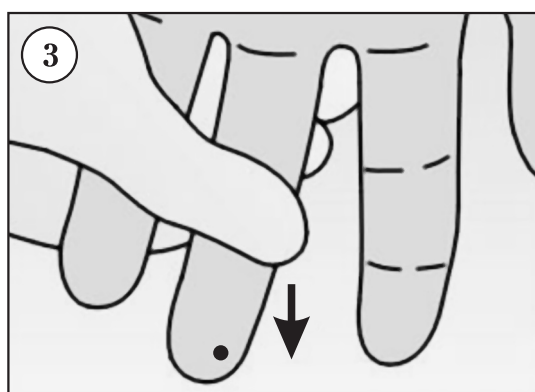
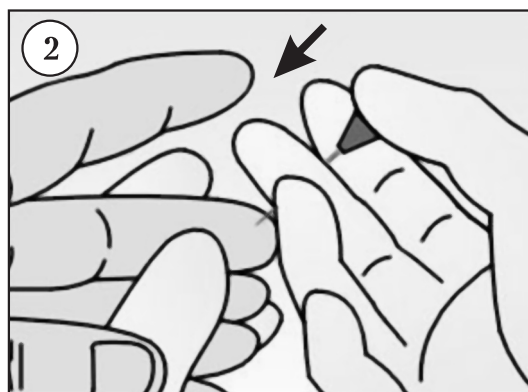
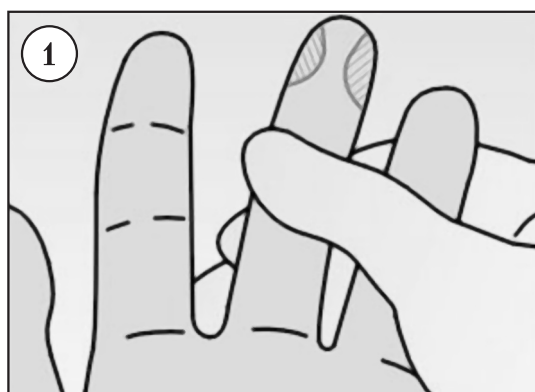
“LindVac mini” (“Impromini”) очень просты и удобны в использовании: край пробирки, который прикладывается к месту взятия крови, имеет неровную поверхность — снабжен желобками, по которым капиллярная кровь стекает в пробирку, не растекаясь по коже пациента. Благодаря отсутствию капилляра взятие крови в **“LindVac mini”** возможно даже у пациентов с гиперкоа-

гуляцией. Еще одна немаловажная деталь — поверхность, контактирующая с местом прокола кожи, до момента взятия крови скрыта под плотно надетой крышкой, что позволяет не допустить нарушения стерильности системы. Бумажная этикетка снабжена всей необходимой информацией о данном виде продукции: производитель; знак СЕ; антикоагулянт; метка, фиксирующая объем забираемой крови; срок годности и лот партии. Наличие этикетки позволяет промаркировать пробу пациента наиболее удобным для лаборанта способом, не прибегая к специальным маркерам.

Взятие капиллярной крови в **“LindVac mini” (“Impromini”)** должно производиться в следующей последовательности:

1. Выбирают неохлажденный, нецианотичный, неотеочный палец. Прокол лучше делать у кончика IV пальца левой руки (у правшей). Можно прокалывать II и III пальцы.





Если руки у пациента холодные, то перед проведением прокола их нужно обернуть на 10–15 мин. довольно горячим полотенцем. Чтобы усилить кровоток, нежно массируют палец от основания к кончику. Тампоном, смоченным в спирт, тщательно обрабатывают кончик пальца и дают поверхности просохнуть.

2. Одной рукой крепко держат палец пациента, а другой рукой выполняют прокол на середине расстояния между центром подушечки пальца и латеральной поверхностью пальца на глубину, достаточную, чтобы получить крупную каплю крови. Первую каплю удаляют стерильным тампоном.

3. Массируя палец от основания к кончику, получают нужное количество крови. Нельзя мять и сжимать палец — это приводит к ложным результатам из-за попадания в кровь межтканевой жидкости. Снимают крышку с **“LindVac mini” (“Impromini”)**, плотно прикладывают пробирку чуть ниже места прокола, желобком к коже. Набирают нужное количество крови в соответствии с маркировкой на пробирке. Закрывают пробирки **“LindVac mini” (“Impromini”)** с кровью крышками от них.

4. Держа одним пальцем за донышко, а другим за крышку, плавно покачать пробирку 8–10 раз для лучшего растворения антикоагулянта.

5. Надписывают этикетки в соответствии с требованиями лечебного учреждения.

Примечание. На бланке ответа обязательно нужно указывать, что кровь на исследования бралась из пальца, так как результаты исследований уровня глюкозы, ге-

моглобина и некоторых других показателей могут отличаться от результатов, полученных при работе с венозной кровью.

Помимо расходных материалов, ООО «КОРВЭЙ» продолжает развивать свой ассортимент и за счет заключения договоров с мировыми лидерами по производству суперсовременного лабораторного оборудования, что позволяет нам полностью оснащать лаборатории всем необходимым для современной и своевременной диагностики. На сегодняшний день мы рады представить ряд анализаторов, произведенных фирмой **«Mindray»**. Впервые появившиеся на российском рынке в 2003 году, они уже работают во многих лечебных учреждениях. Широкий спектр гематологических (в т. ч. ветеринарных), биохимических, мочевых анализаторов позволяет конечному пользователю выбрать наиболее подходящий именно для него прибор.

Также Вы всегда сможете получить необходимую консультацию и приобрести расходные материалы и оборудование для перспективного развития ПЦР и бактериологических лабораторий.

Звоните нам, мы рады услышать Вас ежедневно с 9.30 до 18.00 часов. Совместно с Вами мы делаем все возможное для повышения качества диагностики, лечения и оздоровления пациентов.

Дополнительную информацию Вы всегда можете получить на нашем сайте в Интернете: www.corway.ru или по многоканальным телефонам в Санкт-Петербурге: 380-92-03, 703-43-49.

НОВЫЙ ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР С ПРОТОЧНОЙ КЮВЕТОЙ «БИАЛАБ-100»

А. Н. АСАНОВ

ООО «БИАНАЛИТИКА»

Полуавтоматические биохимические анализаторы давно уже стали стандартными приборами для биохимических лабораторий различных учреждений здравоохранения. Под полуавтоматическим биохимическим анализатором обычно понимают анализатор, при работе с которым подготовка проб, добавление реагентов, инкубация проб и помещение рабочего раствора в измерительную систему прибора проводится вручную, после чего анализатор автоматически проводит все необходимые измерения, обработку, расчет и выдачу результатов. Анализатор хранит в памяти программы методик, калибровки по всем методикам, результаты измерений, формулы расчета, данные контроля качества и т. д. В настоящее время, несмотря на появление большого количества автоматических анализаторов (все стадии анализа выполняются автоматически), полуавтоматические анализаторы продолжают оставаться самым распространенным типом биохимических анализаторов в Российской Федерации. Этот факт обусловлен рядом причин:

1. Наличие в Российской Федерации большого числа малых и средних биохимических лабораторий.

2. Относительно невысокая стоимость полуавтоматических анализаторов.

3. Простота и дешевизна эксплуатации, обслуживания и ремонта полуавтоматических анализаторов.

Изготовители современных полуавтоматических анализаторов постоянно совершенствуют свои приборы, применяя различные технические новинки и разрабатывая специализированное программное обеспечение, для увеличения производительности выполнения анализов, для уменьшения расхода реагентов на выполнение одного анализа, для удобства работы оператора. Основная задача изготовителей — максимально возможно приблизиться по этим характеристикам к автоматическим анализаторам. Тот, кто добьется на этом пути лучших результатов и создаст прибор с минимальным соотношением *цена/качество*, тот и возглавит «соревнование» изготовителей.

В настоящее время на российском рынке в основном представлены полуавтоматические биохимические анализаторы зарубежного производства. Анализаторы с повышенной производительностью (с проточной кюветой и с многокюветными модулями) вообще представлены только импортными моделями.

Однако недавно российские компании из Санкт-Петербурга «Люмэкс» и «БИАНАЛИТИКА» представили на рынке совместную разработку, первый биохимический анализатор с проточной кюветой отечественного производства под торговой маркой «БИА-

ЛАБ-100». Анализатор «БИАЛАБ-100» представляет собой современный микропроцессорный фотометр, снабженный мощным программным обеспечением.

При создании анализатора были использованы передовые достижения современной микроэлектроники и богатый опыт компаний в разработке оптических приборов. В результате удалось создать прибор с характеристиками, не уступающими лучшим зарубежным аналогам, и имеющий оптимальное соотношение *цена/качество*. Анализатор успешно прошел медицинские и технические испытания в рамках МинЗдравСоцРазвития и Госстандарта РФ (Регистрационное удостоверение МЗСР РФ № ФС 02012006/3197-06, Госреестр СИ РФ № 32247-06), в том числе клинические испытания в Санкт-Петербургском Государственном медицинском университете им. И. П. Павлова, в Государственной Педагогической Медицинской Академии, в Ленинградской Областной клинической больнице.

ДОСТОИНСТВА АНАЛИЗАТОРА «БИАЛАБ-100»:

- Высокая стабильность результатов измерения обеспечивается оригинальной оптической схемой с опорным каналом.
- Диалоговый режим ввода программ и выполнения измерений. Русский язык интерфейса.



Рис. 1. Полуавтоматический биохимический анализатор «БИАЛАБ-100»

- Работа с любыми наборами реагентов (открытая система).
- Возможность проведения измерений как в проточной, так и в различного типа наливных кюветах, а также в круглых пробирках диаметром 12 мм.
- Измерительная система анализатора требует для работы малого расхода реагентов: от 250 мкл для проточной кюветы, от 500 мкл — для пластиковых микрокювет и от 1 мл для кювет типа К10 и круглых пробирок диаметром 12 мм.
- Использование специальной встроенной функции «Автоматическая очистки проточной кюветы» позволяет уменьшить расход реагентов при работе с проточной кюветой до 200 мкл.
- Внешний термостат инкубации 37° С на 16 проб.
- Производительность до 100 анализов.
- Печать результатов проводится на встроенном матричном принтере. Распечатка результатов выполняется на обычной бумаге, текст на которой, в

отличие от распечатки термопринтера, не выцветает, и сохраняется длительное время.

- Встроенная программа контроля качества обеспечивает возможность проведения контроля качества с хранением в памяти прибора результатов за последний месяц и печать контрольных карт.
- Вывод на принтер результатов измерений в форме «Бланк Пациентов».
- Программа передачи данных предоставляет возможность выводить все результаты на внешний компьютер.

Комплект поставки анализатора формируется по желанию заказчика и включает в себя по выбору только необходимые пользователю части комплекта. Полный комплект анализатора состоит из: измерительного блока, проточной кюветы с перистальтическим насосом, термостата инкубации проб на 16 пробирок, системы контроля ВОДА/ВОЗДУХ, программы передачи данных на внешний компьютер и комплекта ЗИП.

Мы сделаем Вашу рукопись книгой!



издательско-полиграфическая компания
КОСТА

СПб, Новочеркасский, 58 (812) 445-1002
www.kostaprint.ru e-mail: kostaprn@peterlink.ru

Издательско-полиграфический отдел фирмы "КОСТА" с 1993 года занимается подготовкой и изданием книг. За эти годы мы приобрели большой опыт подготовки специальной, и в частности медицинской, литературы. Среди подготовленных нами книг — работы в области кардиологии, неврологии, хирургии, генетики и других областях медицины. Мы будем рады помочь Вам подготовить к печати юбилейный сборник, монографию, брошюру, методические рекомендации, автореферат. Собственная полиграфическая база позволяет оперативно отпечатать любую полиграфическую продукцию. Кроме того, наши дизайнеры разработают для Вас визитки, наклейки, рекламные листовки, обложки книг. Не тратьте драгоценное время Ваших специалистов — приходите к нам. Сделайте Вашу рукопись книгой — наша специальность.

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ**

ПИСЬМО
от 29 марта 2007 г. № 01И-231/07

**О ГОСУДАРСТВЕННОМ МЕТРОЛОГИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ
И НАДЗОРЕ ЗА ИЗДЕЛИЯМИ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития информирует.

• В соответствии с ранее изданным Приказом Минздрава России от 10.05.2000 № 156 «О разрешении на применение в медицинских целях изделий медицинского назначения и медицинской техники отечественного и зарубежного производства в Российской Федерации» (регистрация Минюста России 03.07.2000 № 2297) и в настоящее время согласно пп. 1.2, 1.3 Административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по регистрации изделий медицинского назначения, утвержденного Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 30.10.2006 № 735 (регистрация Минюста России от 30.11.2006 № 8542), производство, импорт, продажа и применение в медицинских целях изделий медицинского назначения, в т. ч. медицинской техники отечественного и зарубежного производства на территории Российской Федерации, разрешается после их государственной регистрации. Согласно Положению о Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, утвержденному Постановлением Правительства Российской Федерации от 30.06.2004 № 323, регистрацию изделий медицинского назначения уполномочен осуществлять Росздравнадзор.

• В соответствии с п. 5.4.13 Положения о Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 17.06.2004 № 294, Ростехрегулирование осуществляет отнесение технических устройств к средствам измерений в установленном порядке. Однако в настоящее время нормативный правовой акт, устанавливающий порядок отнесения к средствам измерений зарегистрированных изделий медицинского назначения, разрешенных к применению в медицинских целях, отсутствует. Также отсутствует нормативный правовой акт, устанавливающий перечни групп средств измерений, подлежащих поверке, который согласно Постановлению Правительства Российской Федерации

от 16.06.2004 № 284 уполномочено принимать Министерство промышленности и энергетики Российской Федерации.

• С учетом изложенного изделия медицинского назначения, не утвержденные в качестве средств измерений и не внесенные в государственный реестр утвержденных типов средств измерений, в настоящее время государственному метрологическому контролю и надзору не подлежат.

• Проведение работ в отношении изделий медицинского назначения по их испытаниям, утверждению типов средств измерений, методик поверки и разработке перечней средств измерений, подлежащих государственному метрологическому контролю и надзору, к компетенции учреждений здравоохранения не относится.

• В соответствии с предписаниями государственных инспекторов по обеспечению единства измерений по состоянию на 1 марта 2007 г. в субъектах Российской Федерации приостановлена эксплуатация более чем 50 единиц медицинской техники, поставленных в рамках приоритетного национального проекта в здравоохранении (данные автоматизированной системы мониторинга медицинских изделий).

• Прошу руководителей территориальных органов управления здравоохранением субъектов Российской Федерации обеспечить целевое использование медицинской техники и оборудования, поставленных в субъекты Российской Федерации в рамках приоритетного национального проекта в сфере здравоохранения.

• В соответствии с п. 2 статьи 21 Закона Российской Федерации «Об обеспечении единства измерений» действия государственных инспекторов по обеспечению единства измерений могут быть обжалованы в установленном порядке, в т. ч. в суде.

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения
и социального развития
Н. В. ЮРГЕЛЬ

О ГОСУДАРСТВЕННОМ МЕТРОЛОГИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ И НАДЗОРЕ ЗА ИЗДЕЛИЯМИ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Руководитель федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития Н. В. Юргель выпустил письмо за № 01И-231/07 от 29 марта 2007 г. «О государственном метрологическом контроле и надзоре за изделиями медицинского назначения». Копия письма опубликована в этом номере журнала. Данное письмо появилось потому, что в ряде регионов государственные инспектора по обеспечению единства измерений стали выписывать предписания о приостановке эксплуатации приборов, которые были поставлены в учреждения здравоохранения в рамках приоритетного национального проекта «Здоровье».

На самом деле такое письмо должно было появиться значительно раньше, потому что во многих регионах действия надзорных органов Ростехрегулирования приобрели характер «терроризма». Опубликованное письмо Росздравнадзора хотя бы в какой-то мере позволяет противостоять этому «метрологическому беспределу».

Важным положением данного письма является то, что «изделия медицинского назначения, не утвержденные в качестве средств измерений и не внесенные в государственный реестр утвержденных типов средств измерений, в настоящее время государственному метрологическому контролю и надзору не подлежат».

Это означает, что при любых требованиях сотрудников региональных служб надзора в сфере метрологии в отношении эксплуатации в учреждении здравоохранения приборов, которые, по их мнению, являются средствами измерений, руководство учреждения должно потребовать предъявления документа, указывающего на то, что данный прибор внесен в Государственный реестр утвержденных типов средств измерений. Обращаем внимание на то, что если прибор зарегистрирован как средство измерения, то в паспорте обязательно это указывается и имеется отметка о первичной поверке прибора. Если этого в паспорте на прибор нет, то данный прибор не является средством измерения и не подлежит поверке.

Если прибор внесен в государственный реестр утвержденных типов средств измерений, то поверка его в соответствии с действующим законодательством, безусловно, должна проводиться. Однако и здесь нередко имеются нарушения со стороны органов надзора в сфере метрологии. Иногда поверители выполняют процедуру поверки не в соответствии с утвержденной для

данного типа средства измерения методикой поверки, и с применением средств, которые не являются образцовыми средствами измерения. Наличие у поверителя утвержденной методики поверки конкретного типа средства измерения и необходимых средств измерения — это забота территориальных органов надзора в сфере метрологии, а не медицинских учреждений.

Важное разъяснение в письме дается проблеме отнесения технического средства к средству измерения. Пользуясь неотрегулированностью вопроса отнесения технических устройств к средствам измерений, инспектора и госповерители по своему усмотрению объявляют различные приборы средствами измерения, необоснованно требуют проведения поверки этих приборов и, естественно, оплаты поверки медучреждениями, а иногда запрещают эксплуатацию приборов. Нередко в качестве основания для отнесения данного технического средства к средству измерения заявляется присутствие в названии прибора слова «анализатор». Как отмечает в письме Н. В. Юргель, «согласно постановлению Правительства РФ, перечень групп средств измерений, подлежащих поверке, должно составить Минпромэнерго РФ». Пока такого перечня нет. Отсутствует и утвержденный порядок отнесения технических средств к средствам измерений.

Надзорный орган не имеет права по своему усмотрению решать вопрос о том, что подлежит поверке, поскольку не наделен функциями установления правовых отношений. Поэтому надзорный орган в сфере метрологии имеет право контролировать порядок эксплуатации технических средств только тех, которые внесены в Госреестр утвержденных типов средств измерений. Контроль за надлежащим применением всех типов медицинских изделий осуществляет Росздравнадзор РФ. Основанием для того, чтобы ЛПУ имело право применять техническое средство, является регистрационное удостоверение, которое Росздравнадзор РФ выдает по результатам испытаний данного технического средства и экспертизы. При наличии такого регистрационного удостоверения никаких претензий со стороны органов метрологического надзора к ЛПУ быть не может.

Генеральный секретарь РАМЛД,
к. ф.-м. н., А. Н. ШИБАНОВ