



№ 2 (27) апрель 2009

КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор:

Эмануэль В. Л., д. м. н., проф.

Заместители главного редактора:

Зыбина Н. Н., д. б. н., проф.

Сухоруков В. С., д. м. н., проф.

Директор редакции:

Чередниченко Д. В., к. м. н.

Зав. редакцией:

Эмануэль Ю. В., к. м. н.

Редактор перевода:

Филиппова Н. А., к. м. н.

Адрес редакции:

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

Телефон редакции:

(812) 233 97 26

Эл. почта:

ejvcons@mail.ru

Журнал зарегистрирован

в 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 №

Решение Профильной комиссии Экспертного совета в сфере здравоохранения Минздравсоцразвития России по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» от 30 марта 2009 г. (Москва)

1. В соответствии с Приказом № 622 от 05.11.2008 г. Минздравсоцразвития РФ «Об экспертном совете в сфере здравоохранения Министерства здравоохранения и социального развития России» и на основании обсуждения положения в лабораторной службе Профильная комиссия принимает на себя разработку стратегии развития лабораторной службы Российской Федерации.

2. Профильная комиссия констатирует, что клиническая лабораторная диагностика:

- а) Является единой медицинской специальностью;
- б) Обязательной при диспансеризации населения, при выполнении медицинских стандартов, исследованиях по экстренным показаниям, при специализированной, высокотехнологичной медицинской помощи и этим выполняет консолидирующую роль в здравоохранении;
- в) Имеет диагностическую и аналитическую составляющие; для выполнения аналитических исследований в КДЛ могут привлекаться специалисты без медицинского образования.

3. Профильная комиссия создает рабочие комиссии для разработки проектов нормативных документов:

- а) О кадровом потенциале, подготовке, переподготовке и допуске к работе в КДЛ специалистов с медицинским, фармакологическим и немедицинским образованием;
- б) О подготовке документов для включения клинической лабораторной диагностики в образовательный стандарт базовой подготовки врачей в медицинских вузах РФ;
- в) О разработке новой редакции Приказа о совершенствовании лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в ЛПУ РФ;
- г) О разработке концепции централизации/децентрализации лабораторных исследований в РФ;
- е) О порядке метрологического обеспечения лабораторных исследований.

4. Профильная комиссия поддерживает предложение профессора В. Л. Эмануэля о создании Северо-Западного Института лабораторной медицины и рекомендует создать профильные НИИ и научно-методические центры клинической лабораторной медицины на территориях РФ.

5. Профильная комиссия рекомендует при оснащении клинико-диагностических лабораторий отдавать приоритет импортозамещающим изделиям медицинского назначения отечественного производства.

6. Профильная комиссия заинтересована в скорейшем издании «Национального руководства по клинической лабораторной диагностике».

7. Профильная комиссия ставит задачу в рамках Научно-практической конференции «Технологии и инновации в лабораторной медицине» (сентябрь 2009 г.) сформировать рабочие коллективы по разработке «Номенклатуры высокотехнологичных лабораторных исследований» с представлением в Минздравсоцразвития России для их включения в выполнение государственного задания по высокотехнологичным видам медицинской помощи.

*Главный специалист по клинической лабораторной диагностике
Министерства здравоохранения и социального развития,
профессор В. В. Долгов*

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Афанасьев Борис Владимирович,
зав. кафедрой гематологии, трансфузиологии
и трансплантации СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова,
директор Института детской гематологии и трансплантации
им. Р.М. Горбачевой, 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., профессор (заместитель главного редактора)

Карпищенко Анатолий Иванович,
зав. городским организационно-методическим и контроль-
ным отделом по лабораторной диагностике, метрологии,
аллергологии, иммунологии СПб ГУЗ МИАЦ, д.м.н., профессор

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

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, член-корр. РАМН,
з.д.н. РФ, д.м.н., профессор

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Вавилова Татьяна Владимировна,
профессор кафедры госпитальной терапии СПбГМА
им. И.И. Мечникова, зав. курсом клинической
лабораторной диагностики, д.м.н.

Каллнер 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
с клиникой СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова,
проректор по научной работе, 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,
профессор кафедры клинической лабораторной диагнос-
тики с курсом молекулярной медицины СПбГМУ им. акад.
И.П. Павлова, д.м.н.

ИНФОРМАЦИЯ	1
РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ, РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ	2
КАЧЕСТВО МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ	
<i>Ю.В. Эмануэль, А.Л. Хотин</i>	
ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА В ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ	4
<i>А.В. Эмануэль</i>	
ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ СПЕЦИАЛИСТА ПО КАЧЕСТВУ	14
<i>М.Н. Остроумова, М.М. Мнускина</i>	
ОПЫТ УЧАСТИЯ В ПРОГРАММАХ ВНЕШНЕЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ГОРОДСКОГО КОНСУЛЬТАТИВНО-ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ЦЕНТРА № 1 САНКТ-ПЕТЕРБУРГА	21
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ФОРМАТЕ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ	
<i>А.С. Улитина, С.Н. Пчелина, М.В. Дубина</i>	
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ: ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ЭТИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДА	25
<i>Д.Ю. Семенов, М.И. Зарайский, М.Е. Борискова, И.Ю. Сабурова, П.А. Панкова, Н.С. Фещенко, В.Г. Чаусова, У.В. Фарафонова, О.А. Пестерова</i>	
ЗНАЧЕНИЕ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ ГЕНА BRAF В ДООПЕРАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	33
ЛАБОРАТОРНЫЕ АСПЕКТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ	
<i>С.А. Ельчанинова, В.В. Макаренко</i>	
АКТУАЛЬНОСТЬ, ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ОЦЕНКИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ	39
<i>Е.Н. Александрова, А.А. Новиков, Т.М. Решетняк, Т.В. Попкова, М.В. Черкасова, М.А. Диатроптова, Э.С. Мач, Л.Н. Денисов, Е.Л. Насонов</i>	
ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К КАРДИОЛИПИНУ, β_2 -ГЛИКОПРОТЕИНУ I И ПРОТРОМБИНУ ПРИ АНТИФОСФОЛИПИДНОМ СИНДРОМЕ	47
<i>М.В. Иванов, О.Н. Воскресенская, Н.Б.Захарова</i>	
ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ, АПОПТОЗА И ЦИТОКИНОВ ПРИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЯХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО ГЕНЕЗА	59
<i>А.А. Жлоба</i>	
ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ. ЛЕКЦИЯ. ЧАСТЬ 2	64

ПРЕДИСЛОВИЕ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Несмотря на актуальность решения задач по обеспечению качества деятельности организаций здравоохранения, на самом деле проблема обеспечения качества не только сложна для практической реализации, но также и не всегда является понятной с теоретической точки зрения, что и предполагает предварительное изучение этого вопроса.

Данная рубрика продолжает начатую в прошлых номерах нашего журнала серию работ по вопросам обеспечения качества в здравоохранении, связанным с внедрением международных стандартов серии ISO. В этих работах мы будем последовательно и подробным образом рассматривать как основополагающие вопросы по теории качества, так и некоторые специальные прикладные вопросы теории качества, возникающие в конкретных медицинских организациях. При выборе тем и подготовке материалов мы будем учитывать запросы и пожелания наших читателей, уже существующий практический опыт обеспечения качества в организациях здравоохранения, а также происходящие актуальные изменения в нормативной базе в области качества. Мы полагаем, что данные материалы окажутся весьма полезными руководителям и специалистам медицинских организаций при организации эффективного менеджмента, что будет содействовать в конечном счете решению главной задачи — созданию эффективной системы здравоохранения в России.

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА В ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Ю.В. ЭМАНУЭЛЬ*, А.А. ХОТИН**

* Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины
ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Росздрова»

** Санкт-Петербургское отделение Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики,
консультант по системам менеджмента качества

Резюме. В настоящей статье рассматривается история развития и реализации вопросов обеспечения качества и основные требования международных стандартов ISO серии 9000 (стандарты по менеджменту качества). Особое внимание уделяется процессному подходу к организации менеджмента производственной деятельности, а также рассмотрению некоторых типовых процессов при реализации системы менеджмента качества в организациях здравоохранения. Показано, что решение управленческих задач во многом определяет качество оказания медицинских услуг.

Ключевые слова: Стандарты ISO. Системы менеджмента качества (СМК). Менеджмент качества в здравоохранении. ГОСТ Р ИСО 9000-2001. ГОСТ Р ИСО 9001-2001. Качество медицинских услуг. Процессный подход. Типовые процессы в организациях здравоохранения.

USE OF QUALITY CONTROL MANAGEMENT IN HEALTH CARE INSTITUTIONS

JU.V. EMANUEL*, A.L. KHOTIN**

* Clinical laboratory diagnosis department with the course of molecular medicine, State Educational Institution of Higher Professional Education "Saint-Petersburg Pavlov State Medical University, Federal Agency for Health Care and Social Development"

** Saint-Petersburg department of Russian association of medical laboratory diagnosis,
consultant for quality management systems

Summary. In present article the history of development and realization of the problem of quality control and main demands of international standards ISO part 9000 (standards for quality management) is discussed. Main attention is attracted to process-based approach to organization of industrial activity management as well as discussion of several typical processes in realization of quality management systems in health care institutions. It was shown that the solving of administration problems seriously determines the quality of medical services.

Key words: *ISO standards. Quality management systems (QMS). Quality management in health care. State standards ГОСТ Р ИСО 9000-2001, ГОСТ Р ИСО 9001-2001. Quality of medical services. Process-based approach. Typical processes in health care institutions.*

1. Введение. История вопроса

В связи с широким развитием потребительского общества нам всем в жизни постоянно приходится сталкиваться с различными вопросами качества, которые затрагивают самые разнообразные аспекты человеческой деятельности: качество приобретаемых товаров, качество обслуживания, качество производственной деятельности и др.

И в основе рассмотрения и решения данных вопросов находится оценка качества, одними из главных критериев которой являются: эффективность и результативность процессов создания продукции, а также — удовлетворенность потребителей. В свою очередь, данные критерии оценки могут содержать в себе множество других критериев, характеризующих уже особенности конкретной продукции, особенности конкретной организации, производящей данную продукцию, или специфику потребительского вкуса. Именно данные критерии и являются той универсальной шкалой ценностей, которая определяет качество.

Первоначально вопросами качества стали систематически заниматься еще в первой половине XX века. В это время отсутствовало широкое взаимодействие предприятий в процессе производства и каждый решал проблемы качества самостоятельно. Конечно, в большей степени это было реализовано на зарубежных предприятиях, где господствовала конкуренция, которая и подталкивала предприятия к поиску и принятию новых неординарных решений. И хотя вопросы по обеспечению качества включали в себя как более рациональную организацию производственного процесса, так и улучшение потребительских свойств продукции, однако все же в большей степени внимание уделялось интересам производителя, так как все было подчинено рентабельности производства. Причем вначале вопросы качества рассматривались главным образом применительно к продукции, представляющей собой конкретные товары, и только впоследствии в этот круг продукции стали включаться не только материальные объекты, но и программное обеспечение, различные услуги — т. е. все то, что создается в обществе в процессе человеческой деятельности.

Расширение мирового сотрудничества привело к необходимости стандартизации производимой продукции и условий ее создания — с целью унификации контроля качества и защиты потребительского рынка. Так, сначала появляются стандарты качества на отдельные виды продукции, а впоследствии и стандарты в области менеджмента качества. Причем работа по стандартизации проводится как на национальном уровне, так и на международном. И в настоящее время основная деятель-

ность по стандартизации возглавляется Международной организацией по стандартизации (International Standardisation Organisation), что и дало основу названию данных стандартов — ISO (или в русской транскрипции — ИСО). Следует отметить, что основной особенностью стандартов ISO является их высокая профессиональная ценность, основанная на опыте ведущих мировых производителей во всех областях деятельности. Именно поэтому данные стандарты и приняты практически в большинстве стран.

Как показано в работе Зубкова и соавт. [1], в последние годы начинается активное внедрение стандартов ISO и в практику учреждений здравоохранения, в том числе — в практику медицинских лабораторий, а также учреждений, производящих продукцию медицинского назначения, влияющую на качество диагностики и лечения.

Для подтверждения соответствия тем или иным стандартам производится сертификация продукции или сертификация организации (производителя продукции) независимыми Органами по сертификации, которые аккредитованы в соответствующей системе сертификации и уполномочены осуществлять проверку соблюдения требований конкретных стандартов. В нашем случае далее мы будем рассматривать сертификацию именно по стандартам ISO, а также и другие вопросы, связанные с применением стандартов ISO.

2. Основные термины и понятия

Широкому распространению в мире стандартов ИСО (особенно стандартов в области качества) в немалой степени способствовало и такое их свойство, как универсальность. Например, стандарты ИСО серии 9000 (стандарты по системам качества) содержат универсальные требования, одинаково применимые к организациям любого вида деятельности и любой численности. Такая универсальность стандартов достигается, в частности, за счет введения в них некоторых терминов и определений, которые, однако, как показывает опыт, иногда могут вызывать затруднения в однозначности их трактовки. Поэтому мы будем также проводить рассмотрение содержащихся в стандартах отдельных терминов, определений и положений, что поможет, в конечном счете, более правильному пониманию и применению требований стандартов ИСО к деятельности конкретных организаций.

Продукция

Мы часто будем пользоваться общим термином «продукция», под которым будем понимать все то, что производится. Действительно, любая существующая

организация (предприятие, фирма, институт, учреждение и т. д.) в процессе своей деятельности «что-то» производит, и именно за эту произведенную продукцию данная организация получает от потребителей средства для своей деятельности. Существуют следующие категории продукции:

- **товары** (изделия, полуфабрикаты и вообще любая материальная продукция);
- **услуги** (к ним могут относиться, например, услуги туристические, юридические, консультационные, образовательные, транспортные и многие другие);
- **программная продукция** (программное обеспечение);
- **продукты переработки** (перерабатываемые материалы из нефти, газа и т. д.).

В общем случае организация может производить одну или несколько категорий продукции, а также продукцию, элементы которой относятся к разным категориям продукции.

Наша **врачебная деятельность** является одним из самых распространенных видов услуг. Поэтому нашей основной продукцией являются **медицинские услуги**, в том числе: лечебные, лабораторные, консультационные, диагностические, профилактические, образовательные и др. Кроме того, для здравоохранения работают также и организации-производители товаров (лекарственных средств, медико-технических средств), а также организации, выполняющие исследовательскую (проектную) работу, продукцией которых являются новые способы и методики по всем аспектам здравоохранения.

Потребители и поставщики

Говоря о взаимодействии в процессе деятельности различных организаций, вводятся термины **«поставщик»** и **«потребитель»**.

Ясно, что **поставщиком продукции** может быть организация или отдельное лицо, предоставляющее данную продукцию. **Потребителем продукции** может также быть организация или отдельное лицо, получающее данную продукцию. Таким образом, любая организация (или любое лицо) может выступать одновременно как в роли поставщика, так и в роли потребителя.

Кроме внешних «поставщиков» и «потребителей», внутри самой организации также могут быть «внутренние поставщики и потребители» — когда продукция с одной промежуточной операции поступает на другую операцию, или когда результаты выполнения работ одним подразделением передаются затем в другое подразделение. Например, врач является поставщиком услуг непосредственно для пациента (потребителя услуг), а клиническая лаборатория является поставщиком продукции (услуг) для врача, использующего результаты анализа в диагностических или лечебных целях. И таких

цепочек «поставщик» — «потребитель» в организации может быть довольно много, что, в свою очередь, и будет определять конкретные требования к таким взаимодействиям.

Качество

В повседневной жизни нам приходится сталкиваться с различным толкованием данного термина. Иногда приходится слышать о «плохом» или «хорошем» качестве, о «недостаточном» качестве. Но, в любом случае, понятие «качества» не определяется само по себе, а направлено к определенному объекту. Сам же этот объект характеризуется некоей установленной к нему совокупностью требований.

Таким образом, **«качество» определяет степень, с которой совокупность собственных характеристик объекта удовлетворяет установленным требованиям.** Таким объектом может быть, например, продукция, система менеджмента качества, уровень жизни или что-либо другое. И здесь важно подчеркнуть следующее обстоятельство: если установлена совокупность требований к объекту, то неудовлетворение хотя бы одному требованию из этой совокупности автоматически определяет данный объект как **некачественный**. Это важно еще и потому, что очень часто приходится встречаться с таким расхожим мнением, что «важно удовлетворить большинство установленных требований, а оставшиеся мелочи являются несущественными»! Это абсолютное заблуждение, рассчитанное на «авось», которое очень часто проистекает как из непонимания существа вопроса, так и из желания сэкономить на чем-нибудь. И как показывает практика, подавляющее большинство каких-либо происшествий (авария, нарушение, нанесение вреда) как раз и происходит по этой причине.

Итак, «качество» (в любом широком понимании этого термина) — выполнение установленных требований. В смысле, например, взаимодействия «поставщик» — «потребитель» можно даже сказать, что «качество» — это выполнение своих обещаний.

В этой связи также приведем еще один важный термин — **«удовлетворенность потребителя»**, т. е. восприятие потребителем степени выполнения своих требований и ожиданий. Здесь понимается совокупность всех требований в самом широком смысле: и к потребительским свойствам продукции (к ожидаемым свойствам), и к качеству фактического исполнения ожидаемой продукции, и к получаемой при этом гарантии, и к качеству обслуживания потребителей при взаимодействии с поставщиком продукции.

Как устанавливаются требования к **«качеству продукции»**? Большинство требований к продукции устанавливает сама организация-производитель с учетом изучения ожиданий потребителей (по цене, потребительским свойствам, характеристикам). При этом, на-

пример, только цена или только какие-либо отдельные характеристики продукции никак не определяют ее качества. Здесь важно удовлетворение именно всей заявленной к продукции совокупности требований, которые ожидаются потребителями (действительно, для кого-то более важным требованием к продукции является ее невысокая цена, несмотря на возможно менее универсальные технические возможности).

Кроме этого, существует группа обязательных требований, устанавливаемых на государственном уровне, которые прежде всего отвечают требованиям безопасности продукции при ее использовании. Данные требования также должны быть выполнены при создании продукции. В некоторых случаях предъявляются еще и требования по безопасности при производстве или утилизации продукции, а также требования по безопасности для окружающей среды.

Однако установление надлежащих требований к продукции еще не гарантирует ее качества. Поэтому для создания качественной продукции требуется обеспечить также и **«качество организации-производителя»**. И в этом смысле устанавливаются требования к системе менеджмента качества организации (СМК), которая призвана обеспечить «длительное и устойчивое производство продукции, соответствующей установленным требованиям». Именно стандарт ИСО 9001-2000 («Системы менеджмента качества. Требования») и устанавливает всю совокупность требований к менеджменту организации, которая и могла бы обеспечить выпуск качественной продукции (разумеется — в дополнение к требованиям по сертификации самой продукции).

3. Стандарты по системам менеджмента качества

В 1994 году вышла первая версия международного стандарта по качеству ИСО 9001-1994. Он содержал 20 основных требований, которым должна отвечать система качества любой организации. Только в этом случае организация могла получить сертификат, удостоверяющий наличие у нее системы качества. Причем в число таких требований было включено наличие установленного порядка и контроля деятельности организации на всех этапах жизненного цикла продукции — от проектирования до утилизации.

Как оказалось, в данных требованиях не было ничего обременительного, и такая деятельность в организации действительно должна быть, если организация желает нормально работать, производить качественную продукцию и заботиться о своих потребителях. У нас в России данный стандарт был также принят без изменений и вышел в 1996 году как ГОСТ Р ИСО 9001-96.

Действительно, сертификация системы качества стала решать для каждой организации 2 основные задачи.

Внешняя задача — продемонстрировать Органу по сертификации, клиентам, партнерам, поставщикам и другим заинтересованным лицам, что, действительно, такая система качества в организации внедрена и эффективно функционирует.

Внутренняя задача — установить в организации такой порядок производственной деятельности, при котором действительно обеспечивается качественный и стабильный выпуск продукции.

Последнее является особенно важным, поскольку иногда еще бытует мнение, что «внедрение системы качества выполняется только для целей сертификации, т.е. только для какой-то внешней демонстрации своих достоинств, но ничего существенного не дает самой организации, а лишь отнимает у нее дополнительные средства». Мы очень скоро с вами увидим, что это является заблуждением, которое высказывается именно там, где не только проводится недостаточно эффективная работа в организации, но и где, по большому счету, не в полной мере понимают существо процессов создания продукции.

В 2000 году вышла вторая версия стандарта по качеству — ИСО 9001-2000, в которой, кроме установления порядка деятельности и контроля на всех этапах жизненного цикла продукции, добавился ряд новых требований. В России данный стандарт был принят как ГОСТ Р ИСО 9001-2001. Мы далее в наших статьях будем подробно рассматривать все эти требования, но пока лишь отметим главное отличие — новый стандарт предполагает рассмотрение деятельности организации в динамике, в постоянном ее развитии и улучшении, а также и во взаимодействии всех внешних и внутренних субъектов.

Мы неслучайно начинаем рассмотрение стандарта по качеству ИСО 9001-2000, поскольку, как будет видно дальше, все последующие стандарты, в том числе и касающиеся, казалось бы, чисто медицинских проблем, на самом деле произошли от этого стандарта и содержат в себе в явном виде многие из его основных требований.

Кроме выпуска основного стандарта ИСО 9001-2000 здесь же, в серии стандартов 9000, вышел еще один стандарт по качеству ИСО 9000-2000 (соответственно в России — ГОСТ Р ИСО 9000-2001), который называется «Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь». Здесь даются определения основных терминов, включенных в стандарты, а также сформулированы **8 основных принципов менеджмента качества**, которые должны быть реализованы для успешного руководства организацией и улучшения ее деятельности. Вот эти принципы:

1) Ориентация на потребителя. Организация зависит от своих потребителей, и поэтому она должна понимать их текущие и будущие потребности, выполнять их требования и стремиться превзойти их ожидания.

2) Лидерство руководителя. Руководители обеспечивают единство цели и направления деятельности организации. Им следует создавать и поддерживать внутреннюю среду, в которой работники могут быть полностью вовлечены в решение задач организации.

3) Вовлечение работников. Работники всех уровней составляют основу организации, и их полное вовлечение дает возможность организации с выгодой использовать их способности.

4) Процессный подход. Желаемый результат достигается эффективнее, когда деятельностью и соответствующими ресурсами управляют как процессом.

5) Системный подход к менеджменту. Выявление, понимание и менеджмент взаимосвязанных процессов как системой вносят вклад в результативность и эффективность организации при достижении ее целей.

6) Постоянное улучшение. Постоянное улучшение деятельности организации в целом следует рассматривать как ее неизменную цель.

7) Принятие решений, основанное на фактах. Эффективные решения основываются на анализе данных и информации.

8) Взаимовыгодные отношения с поставщиками. Организация и ее поставщики взаимозависимы, и отношения взаимной выгоды повышают способность обеих сторон создавать ценности.

Обратите внимание — это еще не требования, а только принципы. Но именно эти 8 принципов менеджмента качества образуют основу для стандартов на системы менеджмента качества, и только руководство этими принципами и позволяет создать в организации эффективную систему менеджмента качества, отвечающую установленным требованиям. Кроме того, все эти принципы однозначно распространяются и на другие стандарты ИСО, в которых основой является управление качеством, т. е. и на все стандарты ИСО в области медицинской деятельности, которые мы будем рассматривать.

4. Основные требования стандарта ИСО 9001-2000

Стандарт содержит довольно много требований по созданию в организации СМК, поэтому далее мы остановимся на рассмотрении лишь некоторых из них, трактовка которых, по нашему мнению, могла бы вызвать определенные затруднения. При этом следует подчеркнуть, что только выполнение всех установленных стандартом требований дает право на получение сертификата.

1) Как видно уже из названия стандарта, он посвящен не просто «системе качества» (как это было в первой версии), а посвящен **«системе менеджмента качества»**. Т.е. теперь рассматривается активный и динамичный процесс — процесс управления качеством.

2) Стандарт требует внедрения в организации «процессного подхода», что как раз и позволяет вести актив-

ное управление качеством всей деятельности организации. При этом деятельность организации должна быть представлена в виде совокупности множества самых разнообразных процессов, которые в ней реализуются. И, по существу, в стандарте ставится вопрос об управлении всеми этими процессами. Это можно рассматривать как основное требование.

Здесь же нам следует ввести еще один **термин**, установленный стандартом, — **«документированная процедура»** — это документ, описывающий реализацию какого-либо процесса. (Иногда для краткости мы будем называть просто «процедура».)

3) При создании продукции в деятельности каждой организации могут быть самые разнообразные процессы. Для управления всеми процессами они должны быть задокументированы (т. е. должны быть документированные процедуры). И в общем случае все эти процессы могут отличаться для разных организаций, и число процессов может быть также различным. Однако установлено требование, чтобы каждая организация, вне зависимости от специфики деятельности, имела 6 обязательных процедур:

- управление документацией;
- управление записями;
- управление несоответствующей продукцией;
- выполнение корректирующих действий;
- выполнение предупреждающих действий;
- проведение внутренних проверок качества.

И действительно, во всех стандартах ИСО в области медицинской деятельности мы также четко можем увидеть наличие этих шести обязательных процедур.

Любые другие процессы также должны быть задокументированы в том случае, если они реально присутствуют в деятельности организации.

4) Для осуществления деятельности любой организации требуется выполнять разнообразные закупки. Поскольку характер закупок в каждой организации может отличаться определенной спецификой, то стандарт требует в общем случае наличия в организации процедур по «управлению ресурсным обеспечением», включая самые разные виды ресурсов: материальные, человеческие, интеллектуальные и другие. При этом инфраструктура, необходимая для создания продукции, также рассматривается как особый вид ресурсов, требующий управления.

5) Стандарт требует проведения мониторинга и измерений по всем элементам деятельности, включая продукцию, процессы, проверки качества, а также — удовлетворенность потребителей. Это представляет довольно объемным требованием для реализации, поскольку охватывает не только большое количество объектов, но и требует наличия четких метрик и методик, регламентирующих проведение такой контрольной деятельности.

6) Вся полученная информация по мониторингу и измерениям должна постоянно анализироваться с целью определения результативности и эффективности СМК и постоянного ее улучшения. Только в этом случае оправдана деятельность по управлению качеством, которая должна способствовать как освоению новых видов продукции в связи с возрастающими запросами потребителей, так и повышению эффективности самой производственной деятельности.

7) Стандарт требует от высшего руководства организации разработать политику и цели в области качества, возглавить разработку и внедрение системы менеджмента качества, постоянно проводить анализ ее эффективности и результативности и принимать все необходимые меры для ее улучшения. При этом недостаточно только назначить кого-либо из работников ответственным лицом по качеству, а руководству организации рассматривать деятельность по качеству как одну из «рядовых» работ, не входящую в непосредственную компетенцию руководства. Напротив, как следует из указанных выше восьми принципов СМК, — **должно быть лидерство руководства в вопросах разработки и внедрения системы менеджмента качества**. Без выполнения этого принципа, без личной заинтересованности высшего руководства организации, как показывает опыт, вся работа будет обречена на неудачу.

Конечно, мы затронули далеко не все требования стандарта ИСО 9001-2000. Но при рассмотрении конкретных ситуаций и вопросов мы будем более подробно обращаться к этим и другим требованиям, а также к причинам, которыми вызваны данные требования.

5. Процессный подход при создании системы менеджмента качества

Любая деятельность, в которой используются ресурсы для преобразования входов в выходы, может рассматриваться как процесс. Такое определение процесса дает стандарт ИСО 9000-2000.

Действительно, в каждой организации присутствует множество самых разнообразных видов деятельности. Каждый процесс с чего-то начинается, т. е. имеет «вход». На вход процесса поступают некоторые ресурсы, а также некоторые входные данные, которые в результате выполнения процесса преобразуются в выходные данные (в «выходы»). Некоторые из присутствующих в организации процессов четко структурированы, т. е. имеют однозначно указанные «начало» и «окончание» процесса. Пример такого процесса — «обследование пациента».

Некоторые процессы могут представляться нам бесконечными, поскольку постоянно повторяются и одновременно присутствуют в разных фазах. К таким процессам можно отнести, например, процесс «управления документацией». Однако, на самом деле, такие

процессы не являются бесконечными, и поэтому их необходимо также четко структурировать и задокументировать. Как показывает опыт, именно неправильное структурирование какого-либо процесса часто и превращает такой процесс в нечто «бесформенное», что не позволяет эффективно управлять таким процессом.

Все процессы в организации связаны друг с другом многочисленным числом связей и взаимодействуют друг с другом. И часто выход одного процесса связан непосредственно со входом какого-либо другого процесса. Поэтому все процессы должны быть идентифицированы, и должно быть определено взаимодействие всех процессов. После этого становится возможным рассматривать всю деятельность организации как единую систему взаимосвязанных процессов. Именно это и считается **«процессным подходом»**.

Можно указать следующие преимущества процессного подхода при управлении организацией:

1) Из множества присутствующих в каждой организации процессов некоторые процессы считают мелкими и несущественными (второстепенными), и данные процессы иногда выпадают из поля зрения. Однако часто именно такие «мелкие» виды деятельности и вызывают наибольшие проблемы. Поэтому, с точки зрения стандартов ИСО, мелочей не бывает, и все реализуемые виды деятельности одинаково важны, одинаково учитываются и составляют единую систему процессов.

2) При управлении какими-либо процессами с целью внесения в них изменений очень часто не учитывается связь этих процессов с другими процессами в организации (потому что это может не быть очевидным). При этом улучшение одних процессов может приводить к ухудшению других. И только процессный подход поможет избежать этого.

3) Поскольку для реализации процессов требуются различные ресурсы, то процессный подход позволяет, например, произвести эффективную оптимизацию расстановки людей при выполнении процессов и оптимизацию материальных ресурсных потоков.

4) Из-за большого числа процессов оценка и прогнозирование деятельности отдельных организаций может представлять определенные затруднения. Но в случае процессного подхода, обеспечивающего четкую структуризацию всей деятельности, представляются значительные возможности для проведения моделирования деятельности организации, а также использования стандартных математических методов и компьютерной обработки результатов.

Таким образом, одним из предназначений международного стандарта ИСО 9001-2000 как раз и является побуждение применить в организации процессный подход, что должно привести к повышению эффективности ее деятельности.

Среди процессов, которые могут присутствовать в организации, можно различать следующие процессы:

- процессы жизненного цикла продукции (т.е. вся совокупность процессов, описывающих в общем случае создание продукции от стадии ее создания до эксплуатации и последующей утилизации);
- процессы ресурсного обеспечения (по всем видам используемых ресурсов);
- процессы контроля и измерения продукции и процессов;
- процессы управленческой деятельности;
- шесть обязательных процессов, о которых было упомянуто выше (в разделе 4). Данные процессы условно можно отнести к процессам управления и регистрации данных по качеству. Хотя это чисто условное название.

Каким же требованиям, в общем случае, должны удовлетворять все процессы? Для каждого процесса должны быть определены:

- совокупность действий, составляющих содержание процесса;
- «вход» и «выход»;
- совокупность требуемых ресурсов для реализации процесса;
- входные данные;
- выходные данные, а также порядок их дальнейшего использования;
- должностное лицо, ответственное за процесс, которое иногда называют «владельцем процесса».

Таковы основные принципы процессного подхода к рассмотрению деятельности организации, которые обеспечивают ее полный контроль и управляемость.

6. Типовые процессы в организациях здравоохранения

Теперь, когда мы познакомились с основными элементами СМК и основополагающими стандартами в области качества, перейдем непосредственно к рассмотрению особенностей создания СМК в организациях здравоохранения.

Еще раз отметим, что в общем случае под организацией здравоохранения мы можем подразумевать: больницу, поликлинику, диспансер, медицинскую лабораторию, медицинский пункт, какое-либо иное стационарное или амбулаторное медицинское учреждение.

Продукцией перечисленных выше организаций могут быть:

- услуги по лечению заболеваний;
- услуги по проведению медицинских процедур;
- услуги по профилактике заболеваний;
- услуги по проведению медицинских исследований;

- услуги по освидетельствованию состояния здоровья;
- услуги по испытанию медицинских препаратов;
- различные консультационные услуги в области здравоохранения.

Поэтому система менеджмента качества должна быть направлена на улучшение данных услуг.

Исходя из создаваемой продукции (услуг), рассмотрим наиболее типовые процессы, которые могут присутствовать в организациях здравоохранения.

- 1) Регистрация пациента.
- 2) Прием пациента врачом.
- 3) Проведение медицинских анализов.
- 4) Проведение операций.
- 5) Проведение медицинских исследований.
- 6) Проведение медицинских процедур.
- 7) Испытание медицинских препаратов.
- 8) Бытовое обслуживание пациентов.
- 9) Оформление документов для пациентов.
- 10) Наблюдение пациента.
- 11) Подготовка персонала медицинского учреждения.
- 12) Закупка оборудования, материалов, ингредиентов, иных ресурсов.
- 13) Управление контрольным и измерительным оборудованием.
- 14) Организация хранения медицинских препаратов.
- 15) Управление записями.
- 16) Управление документацией.
- 17) Управление несоответствующей продукцией (в данном случае — несоответствующей услугой).
- 18) Проведение внутренних проверок качества во всех подразделениях.
- 19) Проведение корректирующих действий.
- 20) Проведение предупреждающих действий.
- 21) Управление рабочей инфраструктурой и производственной средой, необходимыми для предоставления услуг.

Вот перечень только основных возможных процедур, который для каждой организации может, естественно, отличаться.

7. Примеры сравнения реализации некоторых типовых процессов

Существует одно довольно устойчивое мнение, что в каждой организации можно внедрить некий типовой (или стандартный) перечень процедур для описания и практической реализации ее деятельности. Однако в общем случае это неверно, поскольку деятельность каждой организации является уникальной, хотя и имеются некоторые внешние сходства. И, конечно же, содержание типовых процессов для различных организаций будет отличаться.

Первый пример

Рассмотрим реализацию процесса «прием пациента врачом», осуществляемую в 2-х районных поликлиниках. При кажущейся на первый взгляд стандартности данной ситуации (имеются инструкции Минздрава и других головных организаций) здесь может быть множество отличий, которые зависят от следующих обстоятельств:

1) Различная инфраструктура в поликлиниках. Так, в одной поликлинике просторные холлы для ожидания приема, а в другой — узкие маленькие коридорчики без достаточного количества стульев для ожидающих пациентов. И данное обстоятельство может оказывать в определенной степени влияние на самочувствие пациента, степень его сотрудничества с врачом.

2) Средняя продолжительность обслуживания одного пациента. Этот параметр (при прочих равных условиях, например, квалификации врача) может зависеть от:

- работы медсестры, как до приема пациента, так и во время приема;
- качества предварительной регистрации пациента (например, предварительного информирования его о необходимости принести на прием к врачу какие-либо документы о предыдущих медицинских исследованиях);
- порядка ведения медицинских записей (возможно, степени оснащенности рабочего места медперсонала средствами оргтехники).

3) Порядок назначения врачом проведения необходимых медицинских исследований. В одной поликлинике такие исследования могут быть проведены непосредственно в этот же день (т.е. в день обращения к врачу), в другой поликлинике данные исследования могут растянуться на многие дни. В результате — страдает качество предпринимаемого лечения, а значит — страдает пациент. И в данном случае далеко не всегда причина заключается в нехватке медперсонала (хотя такая причина может быть). Иногда такая ситуация может являться следствием неэффективного менеджмента, не способного оптимизировать деятельность в конкретных реальных условиях без потери качества лечения. Именно для такой цели и применимы стандарты ИСО, которые мы рассматриваем.

4) Квалификация медицинского персонала. Конечно, это также один из главных факторов обеспечения качества лечения. Понятно, что у врачей одной и той же категории может быть фактически разная квалификация. Но есть некоторые организационные меры, которые должны были бы проводиться руководством поликлиники для повышения этой квалификации: периодическое проведение в поликлиниках медицинских конференций, периодическое направление врачей на повышение квалификации. Однако в какой-то поликли-

нике такие конференции могут проводиться в некоторой степени формально, в условиях дефицита времени, не всегда могут быть в должной мере подготовленными. Поэтому часто не происходит главного — передачи опыта в поликлинике от одних специалистов другим. В разных поликлиниках система контроля деятельности молодых врачей со стороны руководства, а также конкретные меры профессиональной помощи могут быть различными, что будет по-разному стимулировать их к повышению своей квалификации.

Мы рассмотрели далеко не все отличия и только в одном элементарном процессе, реализуемом в двух одинаковых, на первый взгляд, поликлиниках. А таких процессов — довольно много. Значит, в разных поликлиниках пациенты будут получать различное по качеству лечение, что является абсолютно недопустимым. Кстати, в зарубежной практике данная проблема решается, например, правом пациента выбирать для лечения любое медицинское учреждение. И это, согласно законам рыночной экономики, приводит к необходимости персонала «неблагополучных» клиник улучшать свою деятельность, либо вообще прекращать ее и уходить с рынка данных услуг.

Обратим внимание в рассмотренном нами примере на одно важное обстоятельство: все указанные отличия зависят в определенной степени от **менеджмента в данной организации**, т.е. от решения управленческих задач. Конечно, могут быть и объективные отличия: например, одна поликлиника функционирует в новом здании, а другая — в старом. Однако хороший менеджмент, а главное заинтересованность высшего руководства способны в определенной степени нивелировать данные различия. Сертификат по качеству могут получить обе поликлиники — и в новом здании, и в старом. Важна здесь постановка общей организации работ. Именно на это и нацеливают стандарты ИСО.

Второй пример

Рассмотрим еще один процесс — **«проведение медицинских анализов»**. Здесь также существует одно довольно устойчивое мнение, что данный процесс является на 100% стандартным процессом, т.к. он проводится в полном соответствии с разработанными и утвержденными методиками. И поэтому данный процесс абсолютно одинаковый для любой лаборатории. А значит — нет необходимости внедрять систему менеджмента качества или какие-либо другие медицинские стандарты ИСО. В чем же здесь дело? И в чем ошибочность такого утверждения о «стандартности» процесса проведения медицинских анализов?

Для этого рассмотрим, какие факторы могут оказывать влияние на реализацию данного процесса в разных лабораториях.

1) Различная инфраструктура в лабораториях. Так, в одной лаборатории имеются в достаточном количест-

ве холодильники для хранения реагентов и контрольных материалов, а в другой нет достаточного места для адекватного хранения материалов, что может привести к их повреждению в процессе хранения, что, в свою очередь, скажется на качестве исследований.

2) Получаемые ингредиенты для проведения анализов могут отличаться по своим свойствам и качеству в зависимости от производителя. Это является очень серьезной проблемой, поскольку качество фирм-поставщиков может существенно отличаться. И поэтому стандарт ИСО 9001-2000 требует установления порядка по выбору поставщиков. При этом, согласно стандарту, вся ответственность за возможные негативные последствия проведения анализов (из-за низкого качества ингредиентов) будет полностью возложена на медицинскую лабораторию. На практике нередко учреждениям приходится покупать более дешевые материалы в ущерб качеству.

3) Аналогичные замечания можно сделать и о поставщиках измерительного оборудования.

4) Важнейшим требованием является проведение работ на исправном и поверенном измерительном оборудовании. Однако данное требование не везде соблюдается — как из-за недостаточной организованности работ, так и вследствие желания «сэкономить». Поэтому возможно получение искаженных результатов измерений. Общеизвестна роль соблюдения правил внутрилабораторного контроля и внешней оценки качества лабораторных исследований.

5) Порядок подготовки и проведения исследования. Известно, что на 60–80% искажения результатов лабораторных исследований как раз и происходят на т. н. «преаналитическом этапе».

6) Идентификация (регистрация) исследований. В различных лабораториях могут отличаться применяемые методы идентификации для ингредиентов, материалов анализов, а также регистрационных записей. Во-первых, известны случаи (хотя и редко), когда ошибки в идентификации приводили к непреднамеренной подмене материалов. Во-вторых, способ идентификации может влиять на качество общей организации работ:

- автоматизацию обработки и регистрации результатов;
- хранение документированных результатов и обеспечение к ним быстрого и санкционированного доступа.

7) Порядок предоставления результатов исследований заинтересованным лицам (пациентам, врачам, организациям). Данный фактор может влиять как на время, так и на удобство при обслуживании пациента.

Это далеко не полный перечень тех процессов, которые могут присутствовать в каждой медицинской лаборатории и решаться абсолютно по-разному. И в этом случае даже казалось бы незначительные отличия в реализации отдельных составляющих процесса в совокупности могут в значительной степени повлиять на процесс обслуживания пациента в лаборатории. Заметим, что мы никак не рассматривали здесь сами методики исследований, медицинские характеристики или биологические параметры. Мы рассматривали только менеджмент процесса «проведение медицинских анализов» и составляющих этого процесса, которые могут существенно влиять на качество проводимых работ.

Конечно, в каждой медицинской лаборатории менеджмент может реализовываться по-своему и быть не похожим на другие. Однако в любом случае он должен быть направлен на выполнение требований стандартов ИСО.

8. Заключение

Мы рассмотрели только некоторые положения стандарта ИСО 9001-2000, который посвящен созданию эффективной системы менеджмента качества в любой организации. Но уже и из этого становится понятной необходимость повышения качества менеджмента в медицинских учреждениях. Действительно, иногда наличие некачественного менеджмента в медицинских учреждениях может свести на нет высокопрофессиональную работу медицинского персонала. Из-за этого страдают люди, теряет престиж наше здравоохранение. И здесь требуется осуществить коренное изменение в производственной деятельности медицинских организаций.

В следующих статьях по проблемам качества мы продолжим более подробное рассмотрение требований стандартов ИСО по качеству и по отдельным вопросам медицинской деятельности, а также рассмотрим особенности реализации системы менеджмента качества в организациях здравоохранения.

Литература

1. Зубков Ю.П., Новиков В.А., Осипова О.Н., Тарасенко О.А., Эмануэль А.В. Внедрение международных стандартов системы ISO в России — проблемы и перспективы // Клинико-лабораторный консILIум, 2008. — № 6. — С. 4–7.
2. ГОСТ Р ИСО 9000-2001. Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь.
3. ГОСТ Р ИСО 9001-2001. Системы менеджмента качества. Требования.

«*Diagnosis cetera - ullae therapiae fundamentum*»
«Достоверный диагноз - основа любого лечения»

2009

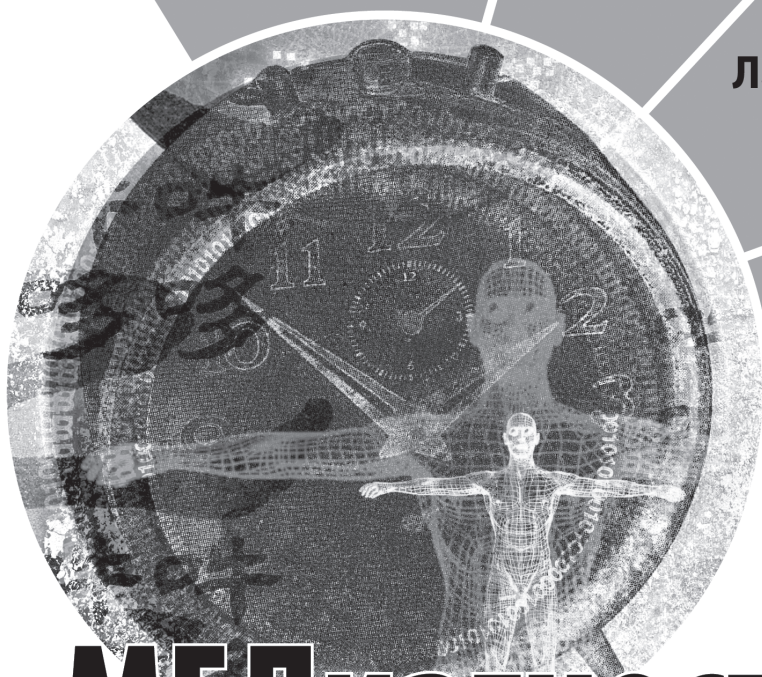
Радиология

В рамках проекта
специализированные
выставки и салоны

МедКомТех

ЛаборДиагностика

Функциональная
диагностика



МЕДдиагностика



5-я международная специализированная выставка

медицинской техники, оборудования и услуг
для диагностики заболеваний человека

Организатор проекта:

Компания «МЕДИ Экспо»

Организаторы научной программы:

Российская ассоциация по
медицинской лабораторной
диагностике (РАМЛД)

Российская Ассоциация
специалистов функциональной
диагностики (РАСФД)

Общество специалистов по
лучевой диагностике

Московское объединение
медицинских радиологов

При поддержке:

Министерства здравоохранения
и социального развития России

Под патронатом:

Торгово-промышленной палаты РФ

Москва, Конгресс-центр
Центра международной торговли

26–28 мая

МНЭ МЕДИ Экспо

Тел.: +7 (495) 661–35–13

Факс: +7 (495) 938–24–58

e-mail: expo@mediexpo.ru

http://www.mediexpo.ru

http://www.radiology-congress.ru



ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ СПЕЦИАЛИСТА ПО КАЧЕСТВУ

А.В. ЭМАНУЭЛЬ

Директор по качеству ООО «Витал Диагностикс СПб», e_artem@mail.ru,
консультант по системам менеджмента качества РАМЛА

Резюме. Целью настоящей публикации мы считаем обсуждение прикладных аспектов разработки и внедрения систем менеджмента качества и предлагаем на рассмотрение читателей реально действующую должностную инструкцию специалиста по качеству. Этот материал обращен к тем организациям, которые только рассматривают возможность подготовки к разработке, внедрению и сертификации системы менеджмента качества (СМК), или уже внедрили СМК и испытывают необходимость ее поддерживать и улучшать.

Также статья может быть полезна организациям, расширяющим отдел качества. Например, если на начальном этапе работы за проектирование и первичное внедрение отвечал один специалист, а на данном этапе развития организации есть необходимость принять на работу еще одного специалиста.

Предложенная схема отработана для СМК, основанной на ISO 9001:2000, ГОСТ Р ИСО 9001-2001 и ISO 13485:2003, и также успешно используется для работы по ISO 15189:2007.

Ключевые слова: система менеджмента качества, должностная инструкция специалиста по качеству, ISO 9001:2000, ГОСТ Р ИСО 9001-2001 и ISO 13485:2003, ISO 15189:2007.

ORGANIZATION OF WORK FOR QUALITY SPECIALIST

A.V. EMANUEL

Quality director, Vital Diagnostics SPb, e_artem@mail.ru, consultant for quality management systems,
Russian association of medical laboratory diagnosis

Summary. The aim of present article is to discuss the applied aspects of working out and implication of quality management systems. We are proposing the really working instruction for quality specialist. This article is aimed at organizations which now are only discussing possibility of working out, introduction and certification of quality management systems, as well as for those who are already using these systems and are planning to support and improve it. The article can be useful also for organizations which are increasing the staff quality control department, for example if at initial stage of the work the project was worked out and implemented by one specialist, but at the moment one more specialist is necessary.

The proposed scheme was worked out and used for quality management systems based on ISO 9001:2000, ГОСТ Р ИСО 9001-2001, ISO 13485:2003, it is also successfully used for work based on ISO 15189:2007.

Key words: quality management system, instruction for quality specialist, ISO 9001:2000, ГОСТ Р ИСО 9001-2001 and ISO 13485:2003, ISO 15189:2007.

Начнем с основных, на наш взгляд, функциональных особенностей специалиста по качеству.

1. Работа с документацией

- Подготовка необходимых, требуемых стандартами процедур;
- Подготовка документов, необходимых для функционирования организации;
- Подготовка пакета документов, которые потребуются непосредственно для аудита;
- Подготовка документов, которые будут использованы в практике работы.

Самым плохим представляется создание СМК «на бумаге». Это может перерасти в большую проблему. Потому что количество документов растет очень быстро, и в какой-то момент у рядовых сотрудников и у высшего руководства может появиться желание сделать так, чтобы все «бумаги» делал специалист по качеству, а «в ре-

альности было так, как им надо». Это ошибочное мнение. С другой стороны, если делать все «как надо», может возникнуть так называемый кризис бюрократии. Мы избежали этого следующим образом. Многие документы СМК, которые необходимы для доказательств соответствия стандартам, действительно носят очень формальный характер. Эти документы практически невозможно использовать «на местах». Но никто не мешает на основе таких бумаг создавать реально действующие схемы, инструкции и т. п., которые будут понятны людям и не будут перегружены сложными ссылками и иными пунктами, которые нужны для соответствия стандартам.

Поэтому одна из важных задач специалиста по качеству — организация документооборота, который необходим и достаточен для нужд прослеживаемости, воссоздания и хранения информации и т. п. (см. п. 4.2.3. и 4.2.4. ИСО 9001:2000) на местах, и интеграция этого

реального документооборота для более глобальных нужд СМК.

2. Работа с персоналом

а) Создание процедур

Грамотно составить документы и процедуры — задача специалиста по качеству. Но это не значит, что он должен самостоятельно создавать рабочие и должностные инструкции и т.п. С другой стороны, трудно требовать от технических специалистов знаний правил составления должностных инструкций. Они не имеют достаточного опыта составления документов административного характера.

Работа по созданию процедур (в данном случае под процедурой мы понимаем широкий спектр документов, регламентирующих любые процессы организации) должна быть разделена на три этапа. Первый этап — сбор необходимой информации. Тут специалист по качеству выступает своего рода интервьюером, который должен понять проблему, собрать варианты ее решения от технических специалистов, после чего, в соответствии с требованиями закона, стандартов, внутренних правил организации, составить необходимый документ. Иными словами, суть любой процедуры должны дать конкретные специалисты, а оформить ее должным образом — это задача специалиста по качеству. С другой стороны, бывают ситуации, когда в организации может не быть какого-либо нужного специалиста. В этом случае специалист по качеству должен изучить вопрос и предложить решение самостоятельно. В этом суть второго этапа работы. Поэтому очень важно выбирать на эту должность человека, имеющего разносторонние практические и теоретические навыки управленческой работы. Наконец, после согласования документов начинается третий, и самый сложный, этап: внедрение новых правил.

б) Разъяснение вводимых правил

Очень часто бывает так, что, создав с трудом новое правило работы, должным образом его оформив и сделав частью СМК, специалист по качеству ограничивается передачей соответствующего документа руководителям подразделений, которых это распоряжение касается. Это не представляется верным. Необходимо собрать мини-совещание и разъяснить всем присутствующим суть вводимых изменений. Ответить на вопросы. Обычно на таком совещании становится ясно, что понимание нового документа у всех присутствующих разное. И задача специалиста по качеству — добиться у присутствующих единого понимания требований нового документа, а главное, чтобы было достигнуто единство их взглядов на то, как данный документ повлияет на выполнение конкретной работы.

в) Контроль

После этого необходимо постоянно контролировать выполнение принятых требований, пока новые схемы работы не войдут в привычку. Мало сделать документ.

Мало сделать его понятным сотрудникам. Мало сделать его в соответствии со стандартами. Мало разъяснить его требования людям. Необходимо заставить их поступать по-новому. И здесь мы хотим обратить внимание на следующее. Мы не согласны с мнением многих и многих специалистов, что нужно все силы потратить на то, чтобы люди сами активно стали хотеть что-то делать и т.п. К сожалению, в нашей стране большинство людей не хотят работать хорошо. Да, можно все это изменить, усилив мотивацию, но те ресурсы, которые на это надо потратить, слишком велики. Поэтому сейчас для большинства людей больше подойдет старая тейлоровская система: контроль и еще раз контроль.

Специалист по качеству должен разъяснять важность вводимых изменений и твердо добиваться их внедрения на всех уровнях организации.

д) «Разбор полетов»

Специалист по качеству должен также выполнять роль «штатного психолога». Необходимо вникать в проблемы людей, в сложившиеся взаимоотношения между подразделениями и сотрудниками и искать пути минимизации негативных последствий конфликтов как рабочих, так и личностных, а также помогать людям использовать в работе их сильнейшие личные и деловые качества.

Практически всегда при внедрении СМК возникают конфликтные ситуации между сотрудниками. Надо понимать, что, по сути, причина этих конфликтов — страх. Страх потерять свою значимость, потерять работу и т.п. Поэтому специалист по качеству должен помогать персоналу организации преодолевать возникающие сложности, добиваясь эффективности работы всей фирмы, и нацеливать людей на результат.

3. Работа с руководством

Что должен сделать директор? Поставить цель и выделить ресурсы. Все. По большому счету, от руководителя не требуется больше ничего — «наймите себе профессионалов, и пусть они за вас работают». Специалисту по качеству надо понимать, что ни высшее руководство, ни сотрудники компании не будут детально вникать в требования стандартов. Вернее, они не могут позволить себе потратить столь драгоценное время на изучение первоисточников (текстов ИСО и т.п.).

Организуя работу специалиста по качеству, необходимо заставить его четко и понятно доводить до сведения руководителя требования стандартов и предлагать несколько вариантов их выполнения.

Проблема в том, что тексты основных стандартов ИСО очень расплывчаты и, на первый взгляд, не конкретны. (И это понятно, так как ИСО 9001, к примеру, применим к любой организации — попробуйте так написать требования, чтобы их можно было применить для небольшого магазина и для высшего учебного заведения.) Специалист по качеству может не быть достаточным профессионалом во всех областях управления

(а ИСО 9001 затрагивает все бизнес-процессы организации). Более того, специфика языка стандарта дает большое поле для интерпретаций. И не очень опытный работник на должности специалиста по качеству может доводить до сотрудников не сами требования стандарта, а свои интерпретации этих требований. Важно всегда об этом помнить. Если к вам как к руководителю приходит сотрудник отдела качества и утверждает, что надо делать что-то только так и никак иначе, — на 99% он ошибается. В стандартах ИСО очень много возможностей для маневра.

4. Работа с аудиторами

Немаловажной стороной работы специалиста по качеству является работа с аудиторами. Эта работа делится на несколько составляющих:

- поддержание контакта на протяжении года;
- работа как непосредственно перед аудитом, так и после аудита;
- работа во время аудита.

Остановимся отдельно на работе специалиста по качеству во время аудита.

Когда аудитор приезжает в организацию, у него есть очень ограниченное время для проверки соответствия. И задача организации — сделать так, чтобы аудитор все успел. Специалист по качеству ориентировочно за две недели до начала аудита получает план аудита. С этим планом необходимо ознакомить сотрудников организации и высшее руководство и подготовить пакет документов по каждому пункту плана. Тем самым вы окажете уважение аудитору, так как ему не нужно будет ждать, пока вы ищите необходимый документ. Следует заранее побеседовать с сотрудниками компании и обсудить план аудита, дать им необходимые разъяснения по требованиям стандарта, чтобы сотрудники не терялись от вопросов аудитора, которые скорее всего будут сформулированы в терминах стандартов. Нужно подсказать сотрудникам, как отвечать на возможные вопросы. Мы сталкивались с ситуацией, когда уже после аудита, анализируя выявленные аудиторами несоответствия, руководители отделов «хлопали себя по лбу» и восклицали: «Так это же все у нас есть! Мы просто не поняли, что от нас хотели».

Кроме этого специалист по качеству должен заранее продумать организационную сторону встречи аудиторов — заказать гостиницу, предоставить транспорт, обеспечить культурную программу и т. п.

И еще одно. Никогда нельзя пытаться скрыть от аудиторов какие-либо проблемные области работы. Если взаимодействие с ними поставлено грамотно, то аудит можно (и нужно) воспринимать как возможность научиться чему-то новому, что даст дополнительный шанс повысить качество продукции и услуг компании, улучшить управление.

Надо помнить, что понимание требований стандартов аудиторами, сотрудниками вашей компании, специ-

алистом по качеству и вами — вещи достаточно разные.

Практика нашей работы показывает, что зачастую требования аудиторов бывают достаточно формальны. Очень часто мы сталкивались с такой ситуацией, когда аудиторы требовали иметь в наличии документы, процедуры и т. п., которые напрямую в стандарте не указаны. Кроме того, очень часто аудиторы предъявляют достаточно жесткие требования к оформлению документов, хотя в самих стандартах об этом нет ни слова. Тут надо понимать несколько особенностей:

1. «Что хорошо взрослому, может быть не очень хорошо ребенку». Любая организация, как и человек, растет и развивается. Нет смысла читать пятикласснику лекции по квантовой механике. А аудиторы часто видят, что принятые в организации механизмы работы уже устарели, что можно делать лучше, и требуют внедрить новые методы работы. Если организация готова, то эти требования аудиторов дадут толчок к развитию и улучшениям.
2. «Привычная» практика работы. Как уже отмечалось ранее, стандарты написаны общими словами, и если не вникать в суть, не сопоставлять и не анализировать разные требования стандартов, может показаться, что все они — сплошная «вода».

Во время аудита часто возникают ситуации, когда аудиторы, проверяя выполнение того или иного требования стандарта, ожидают увидеть механизм работы, который распространен в данной отрасли и который аудиторы наблюдают в большинстве других компаний. Если они не находят привычного им механизма, а в компании принята работа по-иному, могут возникнуть сложности в доказательстве соответствия. Такая ситуация, на наш взгляд, является единственным минусом аудитов на соответствие требованиям ИСО, но обсуждение этой темы выходит за рамки данной статьи.

Приведем один пример. Выполнение требований пункта 6.2.2 ИСО 9001:2000 с точки зрения большинства аудиторов предполагает наличие *общего для всей организации* плана обучения. Хотя в стандарте вы не найдете ни одного слова по этому поводу.

На наш взгляд, эту ситуацию даже можно интерпретировать как торможение прогресса и нового, хотя, с другой стороны, может быть это является попыткой аудиторов уберечь фирмы от «изобретения велосипеда».

Но те из нас, кто учился хоть чему-то, знают, что, по сути, процесс обучения «через опыт» — это и есть то самое пресловутое изобретение велосипеда, без которого нельзя обойтись. Все зависит от персонала вашей организации, но аудиторы, к сожалению, этого часто не учитывают.

3. Рекомендации, разъяснения и т. п. дополнительные «стандарты».

Зачастую в процессе аудита аудиторы используют не только непосредственно стандарты ИСО 9001 и дру-

гие, но и так называемые разъяснения к ним. Например, ИСО/ТО 14969 «Технический отчет, медицинские изделия, системы менеджмента качества, инструкция по применению стандарта». Каков официальный статус этого документа? Обязана ли организация использовать его при внедрении ИСО 13485? По сути, не обязана. Но во время аудита аудиторы могут руководствоваться данным документом для проверки соответствия.

После приведенных выше рассуждений о работе специалиста по качеству предлагаем вам ознакомиться с действующей инструкцией специалиста по качеству, которая разработана и применяется в ООО «Витал Диагностика СПб», а также, с некоторыми вариациями, используется в СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова в лабораторной службе, где в настоящее время проходит подготовка к сертификации разработанной и внедренной СМК (ИСО 9001:2000 и ИСО 15189:2007).

Функциональные обязанности специалиста по качеству: обеспечение функционирования существующей СМК

Основная обязанность специалиста по качеству — обеспечить бесперебойную работу разработанной и внедренной в компании СМК.

Для этого существуют следующие инструменты:

1. Все взаимодействие между подразделениями, сотрудниками на горизонтальном уровне, и взаимодействие сотрудников и администрации (как сверху вниз, так и снизу вверх) должно происходить в виде:
 - служебных записок (для взаимодействия на горизонтальном уровне и взаимодействия «снизу вверх»);
 - распоряжений и/или приказов (для взаимодействия «сверху вниз»).

Специалист по качеству должен обеспечить выполнение данного требования. Для этого он обязан постоянно отслеживать, как происходит взаимодействие между сотрудниками. При обнаружении несоответствия (изменяется взаимодействие, вводится новое правило и т. п. без служебной записки) специалист по качеству должен проводить разъяснительные беседы с сотрудниками. Если выясняется, что администрация компании дала поручение сотруднику сделать некие изменения в СМК, а он забыл создать необходимые документы, специалист по качеству должен опять-таки провести разъяснительную беседу и написать служебную записку в администрацию, чтобы сотруднику, забывшему создать необходимые документы, еще раз на уровне руководства было объяснено, что если администрация дает устное поручение, это не отменяет общего правила по документированию изменений. Специалист по качеству должен донести до всех сотрудников, что если администрация в устной форме дает некое распоряжение, то сотрудник, которому данное распоряжение дано, **обязан**, в первую

очередь, сделать соответствующий документ и передать его в отдел качества.

Также специалист по качеству **должен** обеспечивать своевременное письменное информирование сотрудников о вносимых изменениях в СМК, а также доводить до них любую другую значимую информацию.

Например, если в отделе технического контроля появляется информация, которая может быть полезна менеджерам, то руководитель ОТК обязан написать служебную записку. Важно помнить, что все служебные записки должны проходить в виде копий через отдел качества. Специалист по качеству в этом случае должен проверить, что информация от ОТК дошла до всех заинтересованных лиц.

2. Каждый рабочий день специалиста по качеству должен начинаться с обхода отделов.

Понедельник: складские помещения (все склады и холодные комнаты).

Вторник: производство.

Среда: ОТК и сборка.

Четверг: Отдел разработок и технический отдел.

Пятница: Отделы продаж.

Возможно внесение изменений в график обхода отделов по согласованию с заместителем генерального директора по качеству.

В процессе обхода необходимо искать существующие проблемы как внутри отделов, так и во взаимодействии между отделами, а также проверять выполнение требований стандартов и внутренних требований.

При обнаружении различного рода проблем (несоответствий) необходимо, в первую очередь, детально разобраться в ситуации, вникнуть в проблему и выяснить мнения всех участников проблемного процесса. Мнения должны быть зафиксированы документально. После этого необходимо разработать предложения по решению выявленной проблемы. Данные предложения должны быть согласованы с участниками процесса — либо на совещании с дирекцией, либо путем подписи проекта распоряжения (специалист по качеству передает проект распоряжения участникам процесса, и они подписывают его или вносят коррективы).

Важно понимать, что создание, оформление и обеспечение наличия на местах распоряжений — обязанность специалиста по качеству. Также специалист по качеству отвечает за своевременную актуализацию документов и их визирование (если необходимо, чтобы документ был подписан администрацией, специалист по качеству отвечает за то, чтобы администрация ознакомилась с документом и подписала его в кратчайшие сроки).

Также в обязанности специалиста по качеству входит разъяснение всех правил работы сотрудникам компании. Новые сотрудники должны быть проинструктированы по принятой в фирме системе работы с документами, служебными записками и т. д.

Все новые распоряжения должны быть также устно разъяснены.

В идеале распоряжения, касающиеся изменений взаимодействия, должны содержать простые схемы, поясняющие суть вводимых изменений.

Как в приведенной ниже таблице 1:

Таблица 1

Ежедневная работа специалиста по качеству



3. Доработка/улучшение.

Специалист по качеству отвечает за постоянный поиск возможностей по улучшению существующей СМК. При этом необходимо придерживаться правила «лучшее — враг хорошего». Любую возможность для улучшения необходимо детально проанализировать, принимая во внимание следующие факторы:

- какие цели преследует данное улучшение;
- каковы будут результаты его внедрения;
- какие процессы/отделы оно затронет;
- каков процесс его внедрения;
- какие ресурсы необходимы;
- как изменятся функциональные обязанности сотрудников.

Предложения по улучшению необходимо оформлять в виде служебных записок в администрацию, где будут даны ответы на перечисленные выше вопросы.

При этом важно понимать, что при всей сложности разработки проектов по улучшению одним из критериев оценки работы специалиста по качеству (в том числе при рассмотрении вопроса повышения зарплаты) будет как раз количество и качество таких предложений.

Естественно, основное внимание необходимо уделять возможным улучшениям, связанным с:

- повышением эффективности работы;

- улучшением взаимодействия сотрудников (упрощением такого взаимодействия);
- снижением издержек.

4. Внедрение/разъяснения.

Специалист по качеству отвечает за эффективное внедрение СМК. Для этого он обязан не только контролировать выполнение сотрудниками компании требований, но и, в первую очередь, объяснять всем сотрудникам компании суть вводимых требований.

5. Контроль/аудиты.

Контроль СМК осуществляется в процессе ежедневных обходов отделов, общения с сотрудниками и путем проведения внутренних аудитов.

6. Разработка и внедрение СМК по новым стандартам.

Специалист по качеству обязан самостоятельно изучать используемые в компании стандарты менеджмента качества, а также отслеживать появление новых стандартов. Помимо ИСО, необходимо обращать внимание на документы GHTF и т.п.

Необходимо информировать руководство о возможном использовании новых стандартов в работе фирмы.

7. Работа с документами.

Специалист по качеству несет полную ответственность за организацию, внедрение и контроль документооборота. В его функции входит:

- Работа по созданию новых документов.
- Работа по актуализации документов.
- Организация единообразного хранения документов **во всех** отделах.

Необходимо, чтобы система хранения документов в отделах была единой и прозрачной, чтобы **любой** сотрудник мог найти необходимый документ, даже если руководителя отдела нет на рабочем месте. В первую очередь, это касается общих документов СМК (процедуры, распоряжения, служебные записки, планы, отчеты и т. п.).

Документация, касающаяся работы конкретного отдела, должна храниться в соответствии с правилами СМК (места хранения документов, форма хранения и т. п. должны быть согласованы с отделом качества и описаны в СМК).

- Поддержание в рабочем состоянии удобного пакета документов на местах. Это значит, что не нужно печатать для всех отделов полное руководство по качеству, а нужно сделать выписки из него, касающиеся работы данного подразделения. То есть, готовя пакеты документов для того или иного подразделения, необходимо минимизировать количество бумаг, руководствуясь правилом «необходимо и достаточно», и передавать сотрудникам на изучение ровно столько документов, сколько необходимо им для эффективной работы. Не больше и не меньше.
- Своевременная актуализация документов.

При внесении изменений в существующие документы специалист по качеству должен незамедлительно передавать новые документы на места, разъяснять сотрудникам компании суть вводимых изменений, изымать копии старых документов и заменять их на новые. Проследить, чтобы **все** сотрудники, которые пользовались старой версией документа, были ознакомлены с новой версией.

Дополнить папку организационно-распорядительной документации.

При создании новых документов специалист по качеству обязан незамедлительно оповестить сотрудников, чья деятельность затрагивается новыми документами. Разъяснить суть вводимых требований, ознакомить с ними персонал, дополнить папку организационно-распорядительной документации и пакеты документов на местах.

- Папка организационно-распорядительной документации — важнейший сборник действующих приказов, распоряжений, инструкций и т. п.

Она разделена на части по количеству отделов. В каждой части лежат копии документов, которыми руковод-

ствуется конкретный отдел. По сути, дублирует пакет документов, который находится на местах.

- Ведение реестра всех внутренних и внешних документов, листов рассылки, таблицы актуализации по приведенной ниже схеме (табл. 2).

Реестр документов должен давать ответ на следующие вопросы:

- какие документы на данный момент действуют в компании;
- история создания/изменения документов;
- идентификация документов;
- в каких отделах должен использоваться в работе.

8. Подготовка к аудитам.

Специалист по качеству несет ответственность за подготовку компании к внешним аудитам.

9. Работа по служебным запискам.

Специалист по качеству обязан организовать хранение служебных записок в папке «входящие из отделов».

Специалист по качеству обязан анализировать все входящие служебные записки и обеспечивать:

- чтобы указанные в служебных записках просьбы и предложения, в случае их одобрения, выполнялись;
- чтобы служебные записки были донесены до всех заинтересованных лиц;
- чтобы по служебным запискам проводились необходимые внутренние расследования;
- чтобы служебные записки должным образом хранились на местах.

10. Взаимодействие с сотрудниками.

Специалист по качеству обязан постоянно контактировать со всеми сотрудниками компании на предмет контроля выполнения правил, принятых в компании (в том числе требуемых применяемыми стандартами), для выявления существующих проблем/сложностей в работе и их решении и т. п.

Необходимо, помнить, что **в любой ситуации** специалист по качеству обязан соблюдать нормы вежливости.

Не допускается общение «свысока» с сотрудниками фирмы.

Общение необходимо строить в форме конструктивного диалога.

Необходимо понимать, что в большинстве своем сотрудники на местах являются более компетентными в частных технических вопросах, чем специалист по качеству.

Специалист по качеству **обязан** наладить конструктивное взаимодействие со всеми сотрудниками компании.

Таблица 2

№	Шифр документа	Наименование документа	Внешний / внутренний	Отдел, к которому документ относится (лист рассылки)	Версии (дата, номер версии)	Действует/отменен
---	----------------	------------------------	----------------------	--	-----------------------------	-------------------

Следует иметь в виду, что при всей важности контрольных функций специалист по качеству, в первую очередь, должен быть помощником для всех сотрудников компании. Специалист по качеству должен не просто раздавать поручения и проверять их выполнение, а подсказывать и разъяснять сотрудникам, как именно выполнить ту или иную задачу. Естественно, это касается тех требований, которые являются новыми для сотрудников и выходят за рамки привычных для них обязанностей. Например, изучение новых стандартов и внедрение требований этих стандартов в повседневную работу; создание инструкций и т. п. В этих случаях специалист по качеству должен сам, активно, предлагать свою помощь сотрудникам фирмы.

11. Отчетность руководству.

Еженедельно специалист по качеству готовит отчет в дирекцию.

В отчете необходимо дать краткий обзор своей работы за неделю, описать выявленные сложности в работе фирмы, сообщить обо всех значимых событиях (проанализировав служебные записки, общаясь с сотрудниками и т. п.).

Приложить копии **всех** документов, с которыми велась работа за неделю (если работа не закончена, копии прикладывать не нужно, в дирекцию должны поступать уже готовые проекты документов).

Еженедельные отчеты являются основным документом, который рассматривает дирекция при оценке деятельности специалиста по качеству. Необходимо серьезно и вдумчиво готовить данные документы, сообщая руководству всю необходимую информацию о функционировании СМК и деятельности специалиста по качеству. При этом важно понимать, что обилие не-

существенных деталей значительно ухудшает восприятие отчета и снижает оценку работы специалиста по качеству.

Отчет руководству в идеале должен содержать предложения по улучшению (см. выше, п. 3).

Отчет также должен содержать информацию о новых стандартах, которые можно использовать в работе фирмы (см. п. 6).

12. Специалист по качеству отвечает за организацию работы с несоответствующей продукцией. Учитывая требования п. 8.3 «Управление несоответствующей продукцией» ИСО 9001:2000, а также требования ИСО 14971 «Менеджмент рисков», необходимо составить и поддерживать в рабочем состоянии (актуализировать) список возможных несоответствий в функционировании организации. Список необходимо оформить в виде таблицы (см. табл. 3).

Литература

1. Руководство по качеству. Система менеджмента качества медицинской лаборатории / Под ред. проф. В.Л. Эмануэля и М. Домейка. Авторский коллектив: О.Н. Осипова, В.И. Менченя, Н.Н. Капитулец, А.М. Савичева, Д.В. Чередниченко, А.В. Эмануэль. — СПб.—Тверь: Изд-во Триада. — 2008. — 88 с.
2. Мошкин А.В., Долгов В.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике. Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. — М.: Медиздат, 2004. — 191 с.
3. VIM: International Vocabulary of basic terms in metrology. BIPM, IFCC, ISO, IEC, OIML, IUPAC, IUPAP, Geneva, 1993. — P. 6–10.
4. ГОСТ Р ИСО 9001-2000. Система менеджмента качества. Требования.
5. ГОСТ Р ИСО 15189-2006. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.

Таблица 3

Событие (описать возможное несоответствие)	Вероятная цепочка событий (описать возможные причины возникновения событий*)	Критерии (описать критерии, по которым сотрудники могут определить, что событие произошло и требует вмешательства)	Следствие (возможный вред)	Алгоритм действий	Корректирующие и предупреждающие действия	Ответственный исполнитель
Пример. Этап входного контроля. Нарушение целостности упаковки	— Нарушение правил упаковки при производстве (неправильный материал упаковки, нарушение условий хранения, нарушение техпроцесса упаковки). — Нарушение условий транспортировки (перепад температур, давление, удар).	Внешний вид упаковки	Вероятность загрязнения или изменения свойств продукта (7.4.3)	В соответствии с п. 7.4. Руководства по качеству. Написать служебную записку в отдел качества, с описанием проблемы, предпринятых действий (необходимо для сбора статистики)	Рекламация поставщику (создать инструкцию по оформлению рекламации)	Ответственный за входной контроль.

* Более подробно о цепочках событий смотрите в ИСО 14971 «Менеджмент рисков».

ОПЫТ УЧАСТИЯ В ПРОГРАММАХ ВНЕШНЕЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ГОРОДСКОГО КОНСУЛЬТАТИВНО-ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ЦЕНТРА № 1 САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

М.Н. ОСТРОУМОВА, М.М. МНУСКИНА

Резюме. В работе анализируется многолетний опыт участия лаборатории ГКДЦ № 1 Санкт-Петербурга в различных программах внешнего контроля качества — ФСВОК, Labquality, EQAS. Приводятся результаты 8 законченных циклов по иммунохимии и биохимии в программах ЭКВАС. Организация программ ЭКВАС наиболее удачно решает проблемы регулярного контроля правильности и воспроизводимости лабораторных определений. Анализируются ошибки, обнаруженные с помощью ЭКВАС, их исправление, а также обсуждаются общие условия, которые способствуют надежности диагностического процесса в лаборатории.

Ключевые слова: внешний контроль качества, клинико-диагностические лаборатории, EQAS программа.

EXPERIENCE OF PARTICIPANCE IN EXTERNAL QUALITY EVALUATION IN CLINICAL DIAGNOSTIC LABORATORY OF MUNICIPAL CONSULTATIVE DIAGNOSTIC CENTER N 1 OF SAINT-PETERSBURG

M.N. OSTROUMOVA, M.M. MNUSKINA

Summary. The experience of several years of participation in different programs of external quality control (Labquality, EQAS) of municipal consultative diagnostic center N1 laboratory is analyzed. Results of 8 completely finished cycles of immunochemistry and biochemistry in frames of EQAS program are given. Organization of EQAS programs seems to be the most successful in solving of the problems of regular control of accuracy and reproducibility of the laboratory tests. Mistakes revealed by EQAS system are analyzed, as well as their correction and general conditions which promote the accuracy of diagnostic process in laboratory.

Key words: external quality evaluation, laboratory diagnosis, EQAS program.

Программы внешней оценки качества вместе с внутрилабораторным контролем — важные инструменты для поддержания должного уровня любой лаборатории. Если внутрилабораторный контроль (ВЛК) используется, главным образом, для суждения о воспроизводимости лабораторных исследований количественных тестов в контрольных материалах и лишь частично о их правильности, то внешняя оценка качества (ВОК) окончательно решает вопросы правильности и точности определения этих тестов. Для лабораторного сообщества в целом именно ВОК необходима для обеспечения единства измерений во всех лабораториях — важного компонента диагностического процесса как для врача, так и для пациента.

Поэтому регулярное участие в программах ВОК — хорошая возможность проверки аналитического качества работы лаборатории и своевременного разрешения возникающих проблем.

С самого начала организации внешнего контроля качества в России наша лаборатория активно участвовала во всех предлагаемых вариантах: вначале в межлабораторных сравнениях по городу, затем в Федеральной системе внешней оценки качества и в международных программах.

В 90-х годах прошлого века немногие лаборатории были автоматизированы, тогда как КДЛ Городского диагностического центра с самого своего основания в 1988 году была оснащена биохимическим анализатором «Spectrum» фирмы Abbott и другими приборами.

Поэтому на первых порах участие в ФСВОК показалось нам недостаточно адекватным. Группы сравнения были очень неоднородны, размахи допустимых значений анализов очень велики.

Когда в городе были предложены программы “Labquality” с координационным центром в Хельсинки, наша лаборатория в числе других стала ее постоянным участником наряду с участием в ФСВОК. Однородные группы сравнения и более жесткие границы приемлемости результатов, разработанные экспертами “Labquality”, оказались очень полезны для нас. Лаборатория приобрела необходимый опыт, сравнивая результаты внутрилабораторного контроля качества с межлабораторными сравнениями значений тестов, получаемых в ФСВОК и в “Labquality”.

Однако в 2005 году программы “Labquality” прекратили свое существование в Петербурге. К тому времени ФСВОК существенно усовершенствовалась благодаря автоматизации многих лабораторий. Оценка результатов и даже сроки получения отчетов стали вполне приемлемыми. Но недостатком ФСВОК на настоящий момент, как нам кажется, является неравномерное распределение контрольных измерений в течение года. Все циклы сосредоточены в одно время, ближе к концу года, фактически сориентироваться в правильности определений анализов можно только один раз в году, тогда как потребность возникает достаточно регулярно.

На наш взгляд, удачно решает эту проблему программы ВОК ЭКВАС с координационными центрами в США

и Великобритании. Лаборатория-участник сразу получает необходимые документы и 12 пронумерованных флаконов с лиофилизированным контрольным материалом для участия в программе в течение года. Интервал между исследованиями контрольных образцов составляет 1 месяц (или 2 недели в отдельных программах). Удобна также возможность отправлять результаты контрольных измерений по электронной почте и быстро получать отчет, который помещается на соответствующей странице сайта координационного центра.

ЭКВАС существует уже 25 лет, и в настоящее время количество участников составляет около 2000 лабораторий из 70 стран мира.

Способ оценки качества также удобен, он осуществляется при помощи 10-балльной системы. Правильность результатов лаборатории-участника ВОК оценивается в группах сравнения, которые объединяют лаборатории, использующие одну и ту же тест-систему. Группа сравнения имеет среднее арифметическое и разброс, который оценивается индексом среднеквадратичного отклонения. Индекс среднеквадратичного отклонения — это число стандартных отклонений, на которое результат лаборатории отличается от средней группы сравнения. Идеальное значение этого параметра — 0,0. Это означает, что значение для метаболита, полученное в лаборатории, идентично среднему для группы сравнения. Если результат лаборатории отличается от группы сравнения больше чем на 2 сигмы, то ставится балл 10 (результат неприемлем), если совпадает со средней группы сравнения, то балл 0 (самый хороший). Соответственно, более правильные значения имеют и более низкие баллы. Таким образом, есть возможность количественно оценить качество определения того или иного параметра, сравнить между собой лаборатории, участвующие в данном цикле, дать сведения о работе национальных лабораторных служб и т. д.

Такой способ внешней оценки качества работы лаборатории дает нам возможность нагляднее и яснее представить результаты участия нашей лаборатории в нескольких полностью законченных годовых циклах ВОК ЭКВАС.

Материалы и методы

К настоящему времени, начиная с 2005 года, лаборатория приняла участие в четырех законченных годовых циклах ВОК ЭКВАС по программе «Иммунохимия-12» (28 параметров, включающих гормоны, витамины, онкомаркеры и др.), в трех циклах по программе «Биохимия крови-12» (27 тестов), в одном — по специфическим белкам. Иммунохимические исследования проводились на анализаторе Modular E-170 (Roche), на Access (Beckman-Cutler), биохимические — на ADVIA-1650 фирмы Bayer с адаптацией к нему реактивов и калибраторов фирмы Roche, а в последнее время — на Modular P800 (Roche).

Интервал между исследованием контрольных образцов составлял, как правило, 1 месяц (в цикле по специфическим белкам — 2 недели). Свои результаты посылали по электронной почте при помощи программы, предоставленной нам фирмой БИО-РАД. Отчеты по выполненным анализам в сравнении с другими лабораториями-участниками соответствующих циклов также оперативно получали со своей страницы сайта ЭКВАС. Ежемесячные отчеты содержали страницу резюме, где качество определения каждого аналита оценивается по 10-балльной системе. Кроме того, каждый аналита рассматривался на отдельной странице, где можно было выяснить подробности: данные статистики по всем группам сравнения, гистограммы и диаграммы Леви—Дженнингса.

По окончании годового цикла фирма высылает заключительный отчет, где суммируется выполнение всех тестов по 12 контрольным образцам. Надо отметить, что из 12 образцов только 4 флакона содержат разные концентрации аналитов, и, следовательно, каждая контрольная сыворотка анализируется 3 раза. Это дает возможность, кроме правильности определения, оценить также воспроизводимость определения каждого теста в разные периоды в течение года.

Внутрилабораторный контроль качества осуществлялся при помощи контрольных материалов фирмы БИО-РАД (трехуровневый контроль по иммунологическим тестам — Lyphochek Immunoassay Plus и двухуровневый контроль для биохимии крови — Lyphochek Assayed Chemistry Control). У фирмы Roche мы покупаем контрольные материалы только для новых тестов. Кроме программ контроля качества, имеющихся на каждом современном приборе, для централизованной обработки данных внутреннего контроля использовали лабораторные компьютерные программы «Unity PRO» фирмы БИО-РАД, а в последнее время — новую версию программы АЛТЕЙ версия 5. В отличие от предыдущей версии эта программа лучше соответствует имеющимся контрольным материалам, требованиям ОСТ и удобна в работе.

В октябре 2008 года в лаборатории установлена «Информационная система» фирмы Roche, в которой имеется своя программа для внутрилабораторного контроля качества, в нее собираются все контрольные замечания с основных приборов лаборатории.

Результаты и обсуждение

По окончании цикла каждой программы ВОК участник получает отчет по всем тестам и заключительные таблицы, в которых приводятся рейтинги лаборатории среди всех участников и отдельно среди российских лабораторий. Эти данные не предназначены для публичных сообщений, прежде всего они интересны для конкретной лаборатории, интересна динамика рейтингов по мере развития лаборатории, оснащения ее новыми при-

борами, реагентами, контрольными материалами, исправления замеченных ошибок и т. д.

Мы позволили себе воспользоваться этими количественными критериями работы нашей лаборатории, чтобы обсудить некоторые проблемы, которые возникали в процессе участия в восьми законченных к настоящему времени циклах программ ВОК ЭКВАС.

В таблице приведены рейтинги лаборатории в трех программах ЭКВАС. Они создаются на основе 12 определений всех исследовавшихся метаболитов, всего 68 наименований в течение года или полугода, как в программе по специфическим белкам.

Таблица 1

Рейтинги лаборатории из годовых отчетов ВОК ЭКВАС

Название программы ВОК ЭКВАС	Годы выполнения	Место лаборатории (в скобках указано количество участников)	
		Все лаборатории	Лаборатории России
Ежемесячная иммунохимия: гормоны, витамины, онкомаркеры. Всего 28 тестов			
Цикл 2	2005	1 (228)	1 (28)
Цикл 3	2006	29 (333)	1 (47)
Цикл 4	2007	186 (579)	11 (58)
Цикл 5	2008	50 (792)	3 (73)
Ежемесячная биохимия крови. Всего 27 тестов			
Цикл 4	2005–2006	57 (943)	1 (46)
Цикл 5	2006–2007	79 (1421)	3 (85)
Цикл 6	2007–2008	74 (1718)	3 (106)
Специфические белки 2 раза в месяц, всего 13 тестов			
Цикл 31	2008	39 (496)	1 (13)

Из таблицы 1 видно, как из года в год растет популярность программ ЭКВАС в целом, и особенно заметно увеличивается число ее участников среди лабораторий России, с 2005 года почти в 3 раза.

По окончании цикла координационный центр рассылает перечень оборудования и реактивов, которыми пользуются участники, из него можно понять, на каком оборудовании работают 10, 25 и 50 процентов лучших лабораторий. Это делается для того, чтобы помочь лабораторным службам сориентироваться на рынке реагентов и оборудования.

За исключением 4 цикла по иммунохимии, наша лаборатория входила в 5–7 процентов лучших лабора-

торий-участников соответствующих программ, а по России три раза занимала 1 место. Таким образом, в целом, результаты участия нашей лаборатории в 8 законченных программах ЭКВАС можно оценить как вполне хорошие и стабильные.

Вместе с тем мы долго не могли понять явно неудовлетворительные в сравнении с остальными результаты 4 цикла по иммунохимии. Почти в каждом ежемесячном отчете этого цикла имелись результаты, оцененные на 10 баллов (выходящие за приемлемый предел 2 сигмы), всегда в сторону завышения. При этом внутрилабораторный контроль качества проходил как обычно, и никакие калибровки не меняли результатов как внешнего, так и внутреннего контроля качества. Мы не видели также завышения значений гормонов у пациентов. Много времени прошло, прежде чем мы обнаружили ошибку. К счастью, она не была связана с аналитическими процедурами, а вероятнее всего объяснялась использованием для разведения контрольных образцов автоматических пипеток.

5 цикл по иммунохимии, проводившийся в течение 2008 года, вновь вернул привычные рейтинги нашей лаборатории: а именно вхождение в первые 5–7 процентов от всех участников и 3 место среди лабораторий России. Следовательно, наше предположение об ошибке разведения лиофилизированного материала в 4 цикле по иммунохимии было правильным. Таким образом, мы на собственном негативном опыте убедились, что растворение контрольных материалов и калибраторов необходимо делать только стеклянными пипетками хорошего качества. И хотя все автоматические дозаторы регулярно проверяются специальными службами, все же заметить момент выхода из строя такого дозатора невозможно. Недаром в инструкции к каждому циклу ФСВОК настоятельно рекомендуется использование только стеклянных пипеток высокого качества.

Неожиданностью для нас был результат самого первого участия в программах ЭКВАС в цикле по иммунохимии, когда лаборатория заняла 1 место из 228 лабораторий мира и 1 место из 28 лабораторий России, принявших участие в данном цикле. Отличием этого цикла было то обстоятельство, что работа в основном проводилась на новом, только что установленном приборе.

Естественно, что в дальнейшем рейтинги лаборатории менялись. Сейчас уже можно говорить о стабильном, привычном месте лаборатории, — вхождение в первые 5–7 процентов среди всех участников и 1–3 место среди лабораторий России.

Какие типичные проблемы возникают при регулярном участии в программах ВОК?

Бывает, что значения теста отличаются от средней группы сравнения, при том что выполнена калибровка и внутрилабораторный контроль находится в нормальных пределах. На каждом приборе имеется возможность ввести поправочный коэффициент. Приходится решать,

надо ли это делать немедленно или продолжить наблюдение. Это зависит от конкретного теста. У нас был случай с определением холестерина высокой плотности, его значения мы постоянно завышали. Прошло много времени, прежде чем мы узнали, что на рынке появился реактив следующего поколения. Он дошел до нас позднее, очевидно, остальные участники программы ЭКВАС по биохимии работали уже на новом реагенте с более низкими значениями альфа-холестерина. Поскольку наши пациенты часто наблюдаются в динамике, принимают гиполипидемические препараты, мы не торопились с введением коэффициента. Когда появился новый реагент, коэффициент не понадобился, значения теста точно соответствовали группе сравнения.

Другой пример касается С-реактивного белка, значения которого мы стабильно завышали на 10 процентов. Соответственно, как только мы поняли, что ошибка носит систематический характер, был введен фактор 0,9.

Проблема с магнием, а именно его плохая воспроизводимость, была решена закупкой «кислого мытья» для реакционных кювет Модуляра Р800.

Очень важно как можно точнее выяснить, каким значениям тестов в наших внутренних контрольных материалах соответствуют хорошие результаты внешнего контроля качества. Необходимо учитывать эти значения при перекрытии кончающегося лота с новым лотом контрольного материала. Если этот процесс отлажен и имеется уверенность в соблюдении необходимых процедур внутрилабораторного контроля, то внешний контроль качества обычно проходит достаточно предсказуемо, и лишь немногие «капризные» компоненты требуют внимания, при этом решаются вопросы введения коэффициентов, закупки новых генераций реагентов и т.д. Иногда на это уходит достаточно много времени.

Какие основные факторы, на наш взгляд, определяют хорошее качество работы лабораторной диагностической службы в целом?

- Конечно, в первую очередь лаборатория должна быть хорошо оборудована;
- важно, чтобы оборудование постоянно обновлялось, прогресс в этом отношении очевиден в российских лабораториях; очевидно, что затраты на оборудование и контрольные материалы будут рентабельнее в крупных лабораториях. Именно по этому пути — создания крупных лабораторий идут многие страны цивилизованного мира;
- многое зависит от отношения к лабораторной службе администрации учреждений. В нашем случае главный врач ГКДЦ № 1 с пониманием относится ко всем постоянно возникающим потребностям лаборатории в замене оборудования, совершенствовании технологического процесса, к материальным затратам на контроль качества;
- кадры лаборатории, врачи и лаборанты, каждый на своем рабочем месте должны ответственно отно-

ситься к вопросам качества определений. Эти навыки прививаются в процессе ежедневного внутрилабораторного контроля с использованием контрольных материалов непременно других фирм, нежели производители реагентов и приборов. Мы уже давно пользуемся контрольными материалами фирмы БИО-РАД. Несмотря на то, что в каждом современном приборе предусмотрена программа контроля качества с возможностью ежедневного анализа и накоплением значений, долгое время все количественные параметры вводились нами вручную в программу для внутрилабораторного контроля качества. Наиболее удобна в этом отношении оказалась программа АЛТЕЙ версия 5. В ней предусмотрены отчеты, которые требуются в «Отраслевом стандарте».

С введением лабораторной информационной системы эта работа упростилась, уменьшились ошибки, связанные с ручным трудом. В то же время имеется возможность постоянно следить за качеством определения аналитов в контрольных материалах не только непосредственными исполнителями, но сотрудником, отвечающим за контроль качества, заведующим лабораторией.

Мы понимаем, что только регулярное участие во внешнем контроле качества контролирует правильность наших определений. Аттестованные контрольные материалы для внутрилабораторного контроля, конечно, содержат в своих паспортах средние значения и разброс для каждого теста. Однако они не всегда точно соответствуют тому, что мы получаем на конкретном приборе, и разброс, как правило, существенно больше, чем мы можем это позволить, если хотим получать хорошие результаты в системах внешней оценки качества и в целом в своей практике. Поэтому регулярная информация о правильности или грубых ошибках в наших измерениях, поступающая от ВОК, должна немедленно анализироваться, нужно пытаться найти ошибки и устранить их. Иногда это требует много времени, так как может быть связано с необходимостью замены оборудования, появлением на рынке реактивов новых генераций, не дошедших до лаборатории, и т. д.

Опираясь на хорошо выверенные внутренние контроли, можно стабильно и правильно работать постоянно. Именно это требуется для качественной лабораторной диагностики, и в конечном итоге создает доверие у врачей и пациентов к нашей службе.

Литература:

1. Мошкин А.В., Долгов В.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике. — М.: Медиздат, 2004.
2. Лабораторная служба. Нормативные документы для КДЛ ЛПУ. — МО РАМЛД, Москва, 2003.
3. www.westgard.com.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ: ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ЭТИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДА

А.С. УЛИТИНА*, С.Н. ПЧЕЛИНА*^{***}, М.В. ДУБИНА*

* ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Росздрава», Санкт-Петербург

** Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, РАН, Санкт-Петербург

Резюме. Молекулярно-генетическое исследование (ДНК-диагностика) в настоящее время широко используется в научных и клинических лабораториях. Этот метод важен не только для фундаментальной медицинской науки, но и для решения задач профилактической медицины. У врачей-клиницистов имеется выраженная потребность в систематизированной информации о современном состоянии ДНК-диагностики. В обзоре проанализированы причины высокого интереса к данному методу со стороны врачей различных специальностей. Приведены классификация наследственных заболеваний и перечень молекулярно-генетических исследований, выполняющихся в СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Описаны основные этические принципы молекулярно-генетического исследования, а также даны рекомендации по тактике врачебной беседы с пациентами-носителями генотипов, ассоциированных с повышенным риском развития заболевания.

Ключевые слова: молекулярная генетика, наследственные заболевания, мультифакториальные заболевания, этика, полиморфизм.

MOLECULAR GENETIC DIAGNOSIS IN CLINICAL PRACTICE: FACILITIES AND ETHICAL PRINCIPLES

A.S. ULITINA*, S.N. PCHELINA*^{***}, M.V. DUBINA*

* I.P. Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg

** Petersburg Nuclear Physics Institute, RAS, Saint-Petersburg

Summary. DNA-based diagnosis is now widely-used in scientific and clinical laboratories. This method is not only important for fundamental medical science, but also useful for solving the problems of preventive medicine. We observe that many clinicians are now in intense need of systematized data about actual situation in the field of DNA-based diagnosis. In present review we decompose the reasons of the strong interest in molecular genetic diagnosis among the different medical specialists. Classification of hereditary diseases and the list of the DNA-based tests available in I.P. Pavlov State Medical University are clarified in present publication. We report the main ethical principles that should be kept during the genotyping, and give advice about communication with patients with genotypes associated with increased risk of disease progression.

Key words: molecular genetics, hereditary diseases, multifactorial diseases, ethics, polymorphism.

ДНК-диагностика — объект повышенного интереса со стороны клиницистов различных специальностей

Данной статьей журнал «Клинико-лабораторный консилиум» открывает цикл публикаций, посвященных современному состоянию ДНК-диагностики в различных областях клинической практики. **Актуальность указанной тематики, на наш взгляд, не вызывает сомнений, поскольку обусловлена сочетанием следующих обстоятельств:**

- Количество научных публикаций, посвященных молекулярной генетике, неуклонно возрастает в геометрической прогрессии, причем преобладающее число работ публикуется в англоязычной прессе. Клиницисты, стремящиеся поддерживать свою ква-

лификацию на высоком уровне, часто испытывают нехватку времени на чтение профессиональной литературы в полном объеме, включающем в себя не только информацию о лечебной тактике, но и вопросы современной лабораторной диагностики.

- Расширяются функциональные возможности лабораторий и увеличивается количество ЛПУ, оснащенных оборудованием для выполнения молекулярно-генетических исследований. Благодаря относительно простым методикам и широкому ассортименту предлагаемых фирмами-производителями приборов и реагентов генотипирование вышло за рамки научных лабораторий и уверенно заняло место в ряду рутинных методик.
- В рамках развития маркетинга медицинских услуг возникает необходимость проанализировать спрос на ДНК-диагностику, то есть получить представле-

**Молекулярная генетика
в диагностике моногенных
и мультифакториальных заболеваний**

ние о количестве пациентов, которым данная услуга была бы полезна, чтобы решить вопрос о целесообразности внедрения молекулярно-генетической диагностики на коммерческой основе в данном ЛПУ. Для этого необходима информация о частоте встречаемости генных вариантов, приводящих к развитию редких моногенных заболеваний и повышающих риск развития распространенных мультифакториальных заболеваний, а также о степени влияния данных полиморфизмов на качество жизни пациентов и, следовательно, о степени их заинтересованности в выполнении молекулярно-генетических исследований [27, 31].

- Происходит популяризация достижений медицины в средствах массовой информации (возрастает частота употребления терминов «генетика», «наследственная предрасположенность», «паспорт здоровья»), вследствие чего увеличивается количество пациентов, желающих получить у врача дополнительную информацию на данную тему и выполнить молекулярно-генетическое исследование. Особенно это важно в случае широко распространенных мультифакториальных заболеваний, для которых сведения о роли генетических факторов появились относительно недавно.
- В настоящее время активно развивается новая область приложения ДНК-диагностики — **фармакогенетика**. Как известно, ответ организма на лекарственный препарат определяется совокупностью генетических и внешних факторов [11, 20, 34]. Для некоторых лекарств индивидуальные различия в их метаболизации и выведении могут быть ассоциированы с полиморфизмами в **генах детоксикации** (в частности, гены цитохромов печени). В некоторых случаях перед назначением препарата может быть рекомендована ДНК-диагностика для определения индивидуальной чувствительности пациента [11, 30].

Сотрудники Отдела молекулярно-генетических технологий СПбГМУ стояли у истоков применения ДНК-диагностики для выявления наследственной предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям в Северо-Западном регионе России [18, 19, 21, 22, 23]. В настоящее время в Отделе проводится детекция аллельных вариантов различных генов, ассоциированных с повышенным риском развития некоторых распространенных заболеваний (табл. 2). В рамках повседневной работы часто поступают вопросы от коллег-клиницистов по поводу диагностических возможностей молекулярно-генетического анализа и целесообразности его выполнения у того или иного пациента. Таким образом, имеется выраженная потребность в обобщении и систематизации сведений о современном состоянии ДНК-диагностики.

Геном — это наследственный аппарат клетки, содержащий весь объем информации, необходимой для развития организма, его существования в определенных условиях среды, эволюции и передачи всех наследственных свойств в ряду поколений. Основу генома человека составляет молекула ДНК. С точки зрения наследственности заболевания человека можно разделить на два класса: собственно наследственные болезни, куда входят *хромосомные* и *генные заболевания*, и болезни с наследственной предрасположенностью, которые называют мультифакториальными заболеваниями. Хромосомными являются болезни, вызванные нарушением числа или структуры хромосом (их анализ выходит за рамки данного цикла работ). Генные болезни обусловлены присутствием мутаций в генах. *Моногенными* называются болезни, обусловленные присутствием мутаций в одном гене. В этиологии *мультифакториальных* заболеваний наряду с действием неблагоприятных внешних факторов существенное влияние оказывают состояния не одного, а многих генов (табл. 1). Количество этих генов, формирующих наследственную предрасположенность к заболеванию, иногда исчисляется десятками или даже сотнями. Кроме наследственных, существуют *врожденные* заболевания, которые обусловлены повреждениями плода инфекцией (например, сифилис, токсоплазмоз) или иными внешними факторами (рис. 1).

В ходе выполнения международной программы «Геном человека» (Human Genome Project) было определено общее число генов человека (около 35 000) и произведено их секвенирование (определение первичной нуклеотидной последовательности). Молекулярная медицина и смежные с ней области науки получили стремительное развитие (рис. 2). Информация по программе «Геном человека» представлена в свободном доступе в сети Интернет, в частности, по адресу <http://genomics.energy.gov>.

Впервые молекулярная диагностика наследственного заболевания в России была проведена в 1989 г. под руководством Е.И. Шварца и В.Н. Горбуновой в семьях с муковисцидозом и гемофилией А [1, 23].

В настоящее время известно около 5000 различных **моногенных заболеваний** [7]; примерно для 1000 из них известна локализация поврежденного гена [3]. В публикациях после названия каждого описываемого заболевания часто указывается его энциклопедический номер (OMIM), соответствующий составленному В. Мак-Кью-сиком каталогу генов и моногенных болезней человека («Online Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes»). Каталог OMIM представлен в свободном доступе в сети Интернет по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.

Таблица 1

Основные различия между моногенными и мультифакториальными заболеваниями

Характеристика	Моногенные заболевания	Мультифакториальные заболевания
Количество генов, задействованных в патогенезе заболевания	Как правило, один ген (иногда возможна клиническая гетерогенность: одна и та же клиническая картина в случае поражения разных генов)	Как правило, комплекс генов («генная сеть»)
Типы наследования	Аутосомно-доминантное, аутосомно-рецессивное, сцепленное с полом, митохондриальное	Аддитивно-полигенное с пороговым эффектом
Соотношение генетических и средовых факторов в патогенезе заболевания	Жесткая генетическая детерминация развития болезни. Клиническая картина заболевания в большей степени определяется типом мутационного повреждения ДНК, чем факторами окружающей среды	Нет однозначного преобладания генетических факторов над средовыми. Соотношение генетических и средовых факторов различно не только для каждого заболевания, но и для каждого больного
Частота встречаемости в популяции	Встречаются относительно редко	Широко распространены
Типичные примеры	Муковисцидоз, фенилкетонурия, гемофилия	Атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, остеопороз
Роль ДНК-диагностики	Молекулярная идентификация мутаций в гене является самым объективным способом диагностики. ДНК-диагностика может проводиться на любых стадиях развития, в том числе внутриутробно	С помощью ДНК-диагностики в некоторых случаях можно выявить повышенный риск развития заболевания



Рис. 1. Наследственные и врожденные заболевания

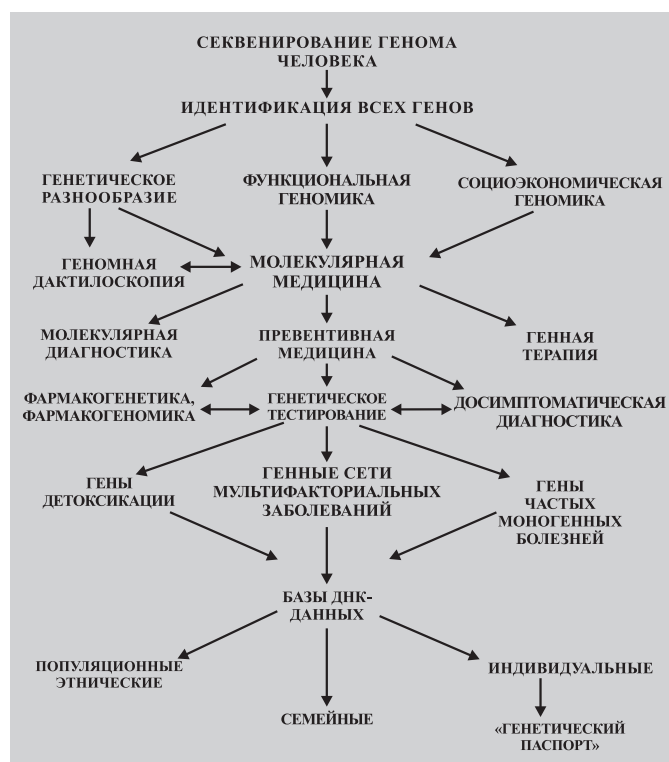


Рис. 2. Направления в исследовании генома человека [3]

В настоящее время в России возможна диагностика практически всех основных, т. е. наиболее тяжелых и частых моногенных заболеваний [2, 3]. Программа массового скрининга новорожденных в России включает в себя диагностику пяти моногенных болезней: фенилкетонурии, гипотиреоза, галактоземии, адреногенитального синдрома, муковисцидоза [8, 9].

Практическое значение молекулярно-генетических исследований не ограничивается диагностикой моногенных болезней. Второе важное направление — это выявление генных вариантов, ассоциированных с повышенным риском развития **мультифакториальных заболеваний**. К мультифакториальным заболеваниям относится подавляющее большинство хронических болезней человека, включая сердечно-сосудистые, эндокринные, иммунные, нервно-психические, онкологические и др. Полиморфизмы «генов предрасположенности» в сочетании с неблагоприятными внешними факторами (нерациональное питание, вредные привычки, загрязнения окружающей среды, инфекции) повышают риск развития заболевания. При этом генетические факторы риска и их распространенность могут иметь популяционную специфичность. В результате исследований, проведенных Отделом молекулярно-генетических технологий СПбГМУ совместно с лабораторией молекулярной генетики человека Петербургского института ядерной физики РАН, были выявлены факторы риска развития таких распространенных заболеваний, как атеросклероз, инфаркт миокарда, ишемический инсульт [14, 15, 16, 17,

24, 25]. С таблицами генетических полиморфизмов, ассоциированных с наиболее распространенными мультифакториальными заболеваниями, можно ознакомиться в соответствующей литературе [2, 3].

Анализ полиморфизмов **генов детоксикации** в некоторых случаях позволяет еще до начала лечения определить индивидуальную чувствительность организма к предлагаемым лекарственным препаратам и наметить наиболее эффективные пути лечения. Такой подход уже применяется на практике в терапии таких мультифакториальных заболеваний, как тромбозы и тромбоэмболические осложнения, эндометриоз, бронхиальная астма и др. [11, 12, 28, 32].

Как правило, **молекулярно-генетическое исследование состоит из следующих этапов**: выделение ДНК из биоматериала (чаще всего это венозная кровь); полимеразная цепная реакция (амплификация специфического фрагмента ДНК); детекция продуктов амплификации (например, путем рестрикционного анализа); интерпретация полученного результата и составление врачебного заключения с практическими рекомендациями пациенту.

Достоинствами молекулярно-генетического метода, основанного на полимеразной цепной реакции, являются его высокая специфичность (обеспечивается использованием праймеров, комплементарных уникальной нуклеотидной последовательности ДНК); высокая чувствительность; технологическая простота; возможность забора биоматериала на исследование в любое

**Перечень полиморфизмов,
детекция которых проводится в ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Росздрава»**

Диагностируемое состояние	Ген	Полиморфизм гена
Тромбозы и тромбоэмболические осложнения	Фактор свертывания крови V (F5)	G 1691 A
	Протромбин (F2)	G 20210 A
	Метилентетрагидрофолат редуктаза (MTHFR)	C 677 T
	Ингибитор активатора плазминогена (PAI-1)	5G/4G
	Гликопротеин IIIa (GP IIIa)	PIA1/PIA2
	Гликопротеин Iba (GP Iba)	Thr 145 Met
	Фибриноген (FBG)	G -455 A
Атеросклероз, инфаркт миокарда	Аполипопротеин E (APOE)	E2/E3/E4
	Гликопротеин IIIa (GP IIIa)	PIA1/PIA2
	Параоксоназа 1 (PON1)	Q 191 R, C -108 T
	Серотониновый транспортер (SLC6A4)	S/L
	Метилентетрагидрофолат редуктаза (MTHFR)	C 677 T
	NO-синтаза (NOS3)	4a/4b
Хроническая обструктивная болезнь легких	Глютатион-S-трансфераза (GSTM1)	Гомозиготная делеция 0/0
	Матриксная металлопротеиназа 9 (MMP9)	C -1562 T
Глухота и тугоухость	Митохондриальная ДНК 12S рРНК	A 1555 G
	Коннексин 26 (GJB2)	35 del G
Повышенная чувствительность к варфарину	Цитохром P450 2C9 (CYP2C9)	*1, *2, *3

время суток, независимо от приема пищи; возможность длительного хранения биоматериала от момента забора до начала исследования. Перспективным является внедрение в ДНК-диагностику высокоэффективных микрочиповых и планшетных технологий, позволяющих одновременно проводить идентификацию большого количества полиморфизмов в одном или многих генах, что важно для диагностики многих моногенных заболеваний, или одного полиморфизма при выполнении скринирующих программ или массовых популяционных исследований [4, 6].

В ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Росздрава» в настоящее время выполняются следующие молекулярно-генетические исследования (табл. 2).

Этические принципы молекулярно-генетического исследования

Добровольность, информированность и конфиденциальность — главные этические принципы современной медицины [29] (рис. 3). Этические принципы медицинской генетики и, в частности, ДНК-диагностики сформулированы в рекомендациях Всемирной Организации Здравоохранения [33]. Информация о генети-

ческом статусе человека может быть сообщена только ему/его опекуну или иному законному представителю и лечащим его врачам. **Передача сведений о генотипе третьей стороне (органам образования, трудоустройства, страхования, социальным службам) недопустима без санкции тестируемого/его законного представителя**, так как это может повлечь за собой дискриминацию такого лица, своего рода «генетический шовинизм» [3]. В России основными нормативными актами в области медицинской этики являются Конституция РФ и Основы законодательства РФ об охране здоровья граждан [10, 13].

В Конституции РФ сформулированы правовые основы для защиты врачебной тайны:

- никто не может быть без добровольного согласия подвергнут медицинским, научным или иным опытам (статья 21);
- каждый имеет право на неприкосновенность частной жизни, личную и семейную тайну, защиту своей чести и доброго имени (статья 23).

Врачебная тайна, являясь личной тайной, доверенной врачу, относится к так называемым профессиональным тайнам. Право на неразглашение врачебной тайны



Рис. 3. Основные этические принципы молекулярно-генетического исследования

принадлежит к числу основных конституционных прав человека и гражданина.

Статья 30 Основ законодательства РФ об охране здоровья граждан гласит, что пациент имеет право на:

- сохранение в тайне информации о факте обращения за медицинской помощью, о состоянии здоровья, диагнозе и иных сведений, полученных при его обследовании и лечении;
- информированное добровольное согласие на медицинское вмешательство;
- отказ от медицинского вмешательства;
- получение информации о своих правах и обязанностях и состоянии своего здоровья, а также на выбор лиц, которым в интересах пациента может быть передана информация о состоянии его здоровья.

Для регламентации работы научных банков ДНК наиболее целесообразным является получение **письменного информированного согласия донора ДНК** на предоставление его образца для научных исследований при соблюдении конфиденциальности [3].

Выявление предрасположенности к моногенным наследственным заболеваниям с поздней манифестацией, при которых отсутствуют методы эффективной терапии (например, хорея Гентингтона), рекомендуется проводить только по достижении совершеннолетия, когда тестируемый в состоянии сам решить, в какой мере ему необходима такая информация. Неблагоприятные результаты досимптоматической ДНК-диагностики в данном случае могут нанести моральную травму пациенту.

При доклинической ДНК-диагностике тестируемый должен быть полностью осведомлен о предлагаемом ему исследовании, в частности, об ограниченной информативности данного метода — о невозможности точного прогнозирования времени начала клинических проявлений заболевания и их степени тяжести.

При ДНК-диагностике чрезвычайно важен конечный этап исследования — интерпретация врачом полученных результатов и выдача письменного заключения с практическими рекомендациями пациенту. Это обусловлено следующими факторами:

Технологический фактор. ДНК-диагностика является надежным методом; при аккуратном соблюдении методики исследования вероятность ошибки мала. Необходимо учитывать, что генотип человека не меняется в течение всей жизни, поэтому типирование того или иного генного варианта достаточно проводить один раз. Подавляющее большинство пациентов по собственной инициативе не стремятся перепроверить результат молекулярно-генетического исследования в другой лаборатории; таким образом, полученные рекомендации оказываются для них пожизненными. Это повышает ответственность врача-лаборанта. В отдельных случаях (при выявлении генотипа, ассоциированного с высоким риском развития тяжелого заболевания) целесообразно проведение повторного молекулярно-генетического исследования, по возможности другим сотрудником лаборатории, чтобы полностью исключить возможность ложно-положительного результата вследствие технической ошибки.

Психологический фактор. При выявлении генотипа, ассоциированного с повышенным риском развития заболевания, важным является вопрос о форме предоставления тестируемому информации о его здоровье. Очень важно адекватно оценить риск развития заболевания при выявлении определенного генного варианта. Необходимо помнить о практически 100% риске развития при ряде моногенных заболеваний и о значительном его снижении при мультифакториальных болезнях. При проведении молекулярной ДНК-диагностики последних необходимо учитывать взаимодействие выявленного

фактора риска с факторами окружающей среды: при наличии определенных сочетаний риск развития заболевания может значительно возрасти. С одной стороны, врач должен убедить пациента в важности профилактических мероприятий — а это зачастую оказывается непростой задачей, поскольку клинические проявления заболевания на момент обследования могут еще отсутствовать, и человек может субъективно ощущать себя полностью здоровым. В то же время беседа с врачом должна иметь своим итогом не запугивание пациента, а формирование у него реалистичного оптимизма и активной жизненной позиции по отношению к собственному здоровью.

Клинический фактор. Молекулярно-генетические технологии в настоящее время развиваются столь активно, что иногда реальные возможности диагностической лаборатории опережают информированность клиницистов данного ЛПУ. Это приводит к недостатку продуманных клинических рекомендаций, поверхностности, а порой и неточности предоставляемой пациентам информации. Для профилактики подобных ситуаций необходимо регулярное образование (курсы повышения квалификации, лекции, семинары) и самообразование (специализированные печатные издания, средства сети Интернет) сотрудников клинического звена. Однако, с нашей точки зрения, многое здесь зависит и от сотрудников молекулярно-генетической лаборатории. При внедрении новой методики, при закупке реактивов для детекции не определявшихся ранее полиморфизмов или при существенных изменениях внешнего вида бланка исследования им следует активно информировать об этом лечащих врачей. В частности, сотрудники лаборатории могут распечатать краткую памятку с ключевой информацией о возможностях ДНК-диагностики в данном ЛПУ и предоставлять ее заинтересованным коллегам других специальностей.

Активное сотрудничество лабораторной службы с лечебными подразделениями — залог максимального уровня качества диагностики, профилактики и терапии.

Заключение

Успехи ДНК-диагностики относятся не только к узкой области наследственных моногенных заболеваний. Они имеют широкое общеклиническое значение и важны для профилактики и терапии мультифакториальных болезней [5, 14, 15, 25, 26]. В настоящее время знание потенциала молекулярно-генетических технологий, основных принципов и методов исследования необходимо для врача любой специальности. Медицинская карта пациента уже в недалеком будущем будет содержать сведения о его генетическом статусе. При этом возрастает ответственность врача в отношении интерпретации результатов ДНК-диагностики и выбора стратегии ведения протестированных пациентов.

Литература

1. Асеев М.В., Иващенко Т.Э., Горбунова В.Н. и др. Выявление гетерозиготного носительства и пренатальная диагностика гемофилии А при помощи ДНК-зондов // Гематология и трансфузиология, 1989. — Т. 11. — С. 10–13.
2. Бочков Н.П. Клиническая генетика: Учебник. — 3-е изд. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2006. — 480 с.
3. Геномика — медицине. Научное издание // Под ред. акад. РАМН Иванова В.И. и акад. РАН Киселева Л.Л. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. — 392 с.
4. Глов А.С., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Опыт использования биочипов в молекулярно-генетической диагностике // Клинико-лабораторный консилиум. — 2007. — № 15. — С. 46–51.
5. Глов А.С., Иващенко Т.Э., Образцова Г.И., Баранов В.С. Молекулярно-генетическая диагностика предрасположенности к артериальной гипертензии // Клинико-лабораторный консилиум. — 2008. — № 4. — С. 46–50.
6. Голденкова И.В. и др. Разработка микрочипа быстрого скрининга генотипа и установления фенотипа ацетилирования для метаболической и генетической паспортизации человека с целью ранней диагностики и индивидуальной фармакотерапии // Фундаментальные науки — медицине. Материалы конференции. Москва, 2–3 декабря 2004 г. — М.: Слово, 2004. — С. 75–77.
7. Горбунова В.Н. Молекулярные основы медицинской генетики. — СПб.: Интермедика, 1999. — 212 с.
8. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. — СПб.: Специальная литература, 1997. — 287 с.
9. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. — М.: Медицинское информационное агентство, 2002. — 82 с.
10. Конституция Российской Федерации // Официальное издание. — Юридическая литература, 1997. — 64 с.
11. Кукус В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. — М.: Реафарм, 2004. — 144 с.
12. Миронова Ж.А., Трофимов В.И., Янчина Е.Д., Дубина М.В. Фармакогенетические аспекты стероидрезистентности у больных бронхиальной астмой // Клинико-лабораторный консилиум. — 2006. — № 13. — С. 60–63.
13. Основы законодательства РФ об охране здоровья граждан. — 4-е изд. — Ось-89, 2006. — 48 с.
14. Пчелина С.Н., Сироткина О.В., Шейдина А.М., Тараскина А.Е., Родыгина Т.И., Демина Е.П., Заботина А.М., Митупова М.И., Баженова Е.А., Беркович О.А., Шляхто Е.В., Шварцман А.Л., Шварц Е.И. Генетические факторы риска развития инфаркта миокарда у мужчин молодого возраста, проживающих в Северо-Западном регионе России // Кардиология. — 2007. — № 7. — С. 29–34.
15. Пчелина С.Н., Сироткина О.В., Шейдина А.М., Беркович О.А., Вавилова Т.В., Шляхто Е.В., Дубина М.В. Генетические факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний: Пособие для врачей. — СПбГМУ, 2006.
16. Пчелина С.Н., Кудинов С.В., Беркович О.А., Черкашин Д.В., Шляхто Е.В., Бойцов С.А., Денисенко А.Д., Шварц Е.И. Ассоциация структурных полиморфизмов промоторной области и кодирующей части гена параоксоназы с развитием инфаркта миокарда у мужчин до 45 лет // Медицинский академический журнал. — 2003. — Т. 2, № 3. — С. 58–64.
17. Родыгина Т.И., Демина Е.П., Шейдина А.М., Зверева В.В., Курьянов П.С., Вавилов В.Н., Шварцман А.Л., Денисенко А.Д., Пчелина С.Н. Влияние вариантов генов ABCA1 транспортера и параоксоназы 1 на риск развития и тяжесть течения атеросклероза // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2007. — № 4. — С. 21–28.

18. Седов В.М., Яицкий А.Н., Данилов И.Н., Мозговой Е.Д., Дубина М.В. Исследование молекулярно-генетических механизмов развития рака желудка: Сборник научных трудов «Новые технологии в хирургии». — СПбГМУ, Санкт-Петербург, 2004. — Т. 3. — С. 199–206.

19. Седов В.М., Яицкий А.Н., Мозговой Е.Д., Волков Н.М., Моисеенко Ф.В., Дубина М.В., Крутовских В.А. Клиническое значение носительства генетического полиморфизма коннексина-26 при раке желудка // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. — 2007. — Т. 166. — № 6. — С. 11–14.

20. Серединин С.Б. Лекции по фармакогенетике. — М.: Медицинское информационное агентство, 2004. — 303 с.

21. Сироткина О.В., Вавилова Т.В., Кадинская М.И., Улитина А.С., Янчина Е.Д., Пчелина С.Н., Дубина М.В. Определение индивидуальной чувствительности к варфарину методом молекулярно-генетического анализа гена цитохрома P450 2C9: Пособие для врачей. — СПбГМУ, 2006.

22. Трофимов В.И., Миронова Ж.А., Янчина Е.Д., Дубина М.В. Фармакогенетические аспекты тяжелой астмы // Пульмонология. — 2008. — № 2. — С. 111–116.

23. Шварц Е.И., Иващенко Т.Э., Гольцов А.А. и др. Использование метода цепной реакции синтеза ДНК для анализа частоты рестрикционного полиморфизма ДНК-локуса CS7 в популяции и в семьях больных муковисцидозом // Докл. АН СССР, 1989. — Т. 307. — № 2. — С. 467–469.

24. Шейдина А.М., Пчелина С.Н., Демидова Д.В., Родыгина Т.И., Тараскина А.Е., Топерверг О.Б., Беркович О.А., Демина Е.В., Шварц Е.И., Погода Т.В., Генерозов Э.В., Говорун В.М., Лопухин Ю.М., Шевченко Ю.А. Анализ частоты выявления четырех структурных полиморфизмов ДНК в промоторной и 5'-нетранслируемых областях гена ABCA1 у мужчин, перенесших инфаркт миокарда в молодом возрасте // Кардиология. — 2004. — № 8. — С. 40–45.

25. Шейдина А.М., Пчелина С.Н., Родыгина Т.И., Сироткина О.В., Тараскина А.Е., Ходжаянц Н.Е., Шварцман А.Л., Шварц Е.И. Аллель-

ные варианты генов PON1 и ABCA1 как факторы риска развития ишемического инсульта // Медицинская генетика. — 2006. — Т. 2. — С. 40–44.

26. Шейдина А.М., Сироткина О.В., Пчелина С.Н., Вавилова Т.В., Папаян К.А., Папаян Л.П., Шварц Е.И. Генетические факторы риска развития тромбозов в молодом возрасте // Вопросы современной педиатрии. — 2005. — Т. 4. — № 2. — С. 42–46.

27. Экономика здравоохранения // Под ред. проф. Вишнякова Н.И. и проф. Миняева В.А. — СПб.: Изд-во НИИХ СПбГУ, 1999. — 160 с.

28. Daly A.K., Aithal G.P. Genetic regulation of warfarin metabolism and response // Semin. Vasc. Med. — 2003. — Vol. 3. N 3. — P. 231–238.

29. EUROGAPP Project 1999–2000. Genetic Tests // Insurance and Employment: Technical, social and ethical issues. Background Document. — 2000. — P. 37.

30. Goldstein J.A. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily // Br. J. Clin. Pharmacology. — 2001. — Vol. 52. — P. 349–355.

31. Higashi M.K., Veenstra D.L. Managed care in the genomics era: assessing the cost effectiveness of genetic tests // Am. J. Manag. Care. — 2003. — Vol. 9. — P. 493–500.

32. Pchelina Sofya N., Sirotkina Olga V., Taraskina Anastasiya E., Vavilova Tatyana V., Shwartsman Alexander L., Schwartz Eugene I. The frequency of cytochrome P450 2C9 genetic variants in Russian population and their associations with individual sensitivity to warfarin therapy // Thromb. Res. — 2005. — Vol. 115. — N 3. — P. 199–203.

33. Proposed International Guidelines on Ethical Issues in Medical Genetics and Genetic Services. Report of WHO Meeting on Ethical Issues in Medical Genetics. Geneva, 15–16 December 1997 // World Health Organization. Human Genetic Programme, 1997. — 15 p.

34. Witzmann F.A., Grant R.A. Pharmacoproteomics in drug development // The Pharmacogenomics Journal. — 2003. — Vol. 3. — P. 69–76.

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

ЗНАЧЕНИЕ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ ГЕНА BRAF В ДООПЕРАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.Ю. СЕМЕНОВ**, М.И. ЗАРАЙСКИЙ*, М.Е. БОРИСКОВА**, И.Ю. САБУРОВА*,
П.А. ПАНКОВА**, Н.С. ФЕШЕНКО**, В.Г. ЧАУСОВА**, У.В. ФАРАФОНОВА**,
О.А. ПЕСТЕРОВА*

* Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины

** Кафедра общей хирургии, СПбГМУ им. И.П. Павлова

Резюме. Вопрос дооперационной диагностики рака щитовидной железы (РЩЖ) в настоящее время остается актуальным в связи со сложностями цитологической интерпретации ТАБ. Целью работы стало исследование диагностической значимости выявления мутации BRAFV600E в дооперационной диагностике РЩЖ. В исследование были включены 30 пациентов, наблюдавшихся в клинике общей хирургии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, у которых нельзя было исключить на дооперационном этапе РЩЖ. ДНК выделялась сорбентным методом из ткани ЩЖ, взятой методом ТАБ. Выявление мутации гена BRAF проводилось с помощью ПЦР с праймерами, характерными для дикого и мутантного типов гена. У 10 пациентов из 12 с гистологически подтвержденным папиллярным РЩЖ и у 1 пациента с фолликулярным раком была выявлена мутация BRAFV600E. У восьми пациентов с гистологически верифицированными доброкачественными заболеваниями ЩЖ данная мутация не определялась. Встречаемость BRAF мутации у пациентов с папиллярным РЩЖ составила 83,3%. Исследование мутации BRAFV600E может использоваться в дооперационной диагностике РЩЖ.

Ключевые слова: дооперационная диагностика, рак щитовидной железы, мутации гена BRAF, ПЦР.

SIGNIFICANCE OF MUTATION OF BRAF GENE IN PRE-OPERATION THYROID CANCER DIAGNOSIS

D.JU. SEMENOV**, M.I. ZARAIISKI*, M.E. BORISKOVA**, I.JU. SABUROVA*, P.A. PANKOVA**,
N.S. FESHCHENKO**, V.G. CHAUSOVA**, JU.V. FARAFONOVA**, O.A. PESTEROVA*

* Department of clinical laboratory diagnosis with the course of molecular medicine

** General Surgery department State Educational Institution of Higher Professional Education
“Saint-Petersburg State Pavlov Medical University, Federal Agency for Health Care and Social
Development”

Summary. Problem of pre-operation diagnosis of thyroid cancer is actual because of the difficulties of cytological interpretation of the biopsy results. The aim of the study was to investigate the diagnostic significance of BRAFV600E gene mutation in pre-operation diagnosis of thyroid cancer. The trial included 30 patients observed in General Surgery clinic. In all these patients at pre-operation stage the thyroid cancer couldn't be excluded. DNA was obtained from thyroid gland tissue taken by biopsy, sorbent method was used. Mutation of BRAF gene was evaluated by PCR with primers, typical for wild and mutant gene types. In 10 patients from 12 with histologically confirmed papillary cancer of thyroid gland and 1 patient with follicular cancer the BRAFV600E mutation was revealed. In 8 patients with histologically verified benign thyroid gland diseases this mutation was not found. Incidency of BRAF mutation of papillary cancer of thyroid gland was 83,3%. Investigation of BRAFV600E mutation can be used in pre-operation diagnosis of thyroid cancer.

Key words: pre-operation diagnosis, thyroid cancer, BRAF gene mutations, PCR.

В последнее время отмечается рост количества больных с узловыми образованиями щитовидной железы (УОЩЖ) (1, 4).

Узловые поражения щитовидной железы обнаруживают у 5–70% населения [1, 2, 6, 28]. Актуальность проблемы дифференциальной диагностики УОЩЖ заключается в том, что по некоторым данным от 10 до 22% солитарных узлов щитовидной железы являются злока-

чественными, а почти в 90% случаев рак щитовидной железы на ранних стадиях развивается под маской узлового зоба [3].

Традиционно для дифференциальной диагностики УОЩЖ используется тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) под контролем УЗИ с последующим цитологическим исследованием биоптата. Однако цитологический метод имеет ряд ограничений: а именно

получение при ТАБ неинформативных и неопределенных результатов. Неопределенные результаты ТАБ связаны с отсутствием точных цитологических критериев для дифференциальной диагностики ряда доброкачественных и злокачественных заболеваний щитовидной железы (ЩЖ). Доля таких аспиратов весьма высока и составляет в среднем около 30% [18, 20]. Таким образом, невозможность на дооперационном этапе имеющимися методами исключить опухолевую природу узла ЩЖ является показанием к выполнению диагностической операции. При хирургическом вмешательстве лишь в 15–20% неопределенных результатов цитологического исследования выявляется злокачественный процесс [7, 11]. На сегодняшний день окончательный диагноз может быть установлен только в результате гистологического исследования.

Таким образом, поиск новых методов дооперационной дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы является одной из актуальных проблем современной тиреологии, что позволило бы улучшить диагностику рака щитовидной железы и сократить количество диагностических операций.

В настоящее время исследование событий молекулярного уровня занимает ведущее место в определении патогенеза различных форм рака ЩЖ и, соответственно, может быть применено и в диагностических целях.

Целью настоящей работы являлось выявление значимости наличия мутации V600E в гене BRAF в дооперационной диагностике рака ЩЖ.

Материалы и методы

Характеристика групп пациентов

В исследование были включены 30 пациентов, обследованных на базе кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины и оперированных на кафедре общей хирургии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова в период с 2007 по 2008 год. Средний возраст пациентов составил $49 \pm 8,5$ лет; соотношение мужчин и женщин — 1 : 9,7 соответственно.

У 65% пациентов узлы ЩЖ были выявлены впервые, 35% пациентов наблюдались у эндокринолога по поводу доброкачественных заболеваний щитовидной железы, у 10% из них в анамнезе имелись оперативные вмешательства на щитовидной железе по поводу доброкачественных заболеваний в объеме гемитиреоидэктомии с истмусэктомией.

Большинство (80%) пациентов были направлены эндокринологом, у 20% пациентов узлы щитовидной железы явились случайной находкой при ультразвуковом исследовании.

Всем пациентам было выполнено стандартное клиническое обследование, определение уровня ТТГ, свободного Т4, УЗИ ЩЖ, ТАБ узлов ЩЖ под контролем УЗИ. По показаниям выполнялось радионуклидное сканирование щитовидной железы с I 123.

Ультразвуковое исследование проводилось по стандартной методике. Анализ ультразвуковых характеристик исследуемых узловых образований ЩЖ показал, что для рака щитовидной железы более характерны гипоехогенные узловые образования (89,7%) с нечетким контуром (62%) и неровной границей (58%), с микрокальцификатами (92%). Однако в настоящий момент ни один из ультрасонографических признаков, за исключением большого размера узла, нарушающего функции соседних органов, не позволяет ставить показания к хирургическому лечению. Дифференциальная диагностика между узловым зобом, аденомой и раком возможна только при морфологическом исследовании.

Всем пациентам до операции была выполнена тонкоигльная аспирационная биопсия (ТАБ) под контролем УЗИ с последующим цитологическим исследованием аспирата в цитологической лаборатории ЦЛД СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Пункционная тонкоигльная биопсия проводилась по стандартной методике под контролем ультразвукового исследования (табл. 1).

Таблица 1

Распределение пациентов по группам в зависимости от цитологического диагноза

Результат ТАБ	Доброкачественный (УКЗ)	Злокачественный (ПР)	Неопределенный (ФО)
Количество пациентов	9	12	9

УКЗ — узловой коллоидный зоб, ПР — папиллярный рак, ФО — фолликулярная опухоль.

На основании цитологического диагноза пациенты были разделены на три группы: группа, куда вошли пациенты с коллоидным зобом, группа пациентов с папиллярным раком и пациенты, у которых цитологическое заключение звучало как «фолликулярная опухоль», т. е. на основании цитологического заключения нельзя было исключить злокачественную природу узла. Все пациенты были прооперированы. Показанием к операции были: папиллярный рак и фолликулярная опухоль по данным ТАБ. Следует отметить, что у одного пациента с цитологическим диагнозом «фолликулярная опухоль» клинически имела место токсическая аденома. У 9 пациентов с диагнозом УКЗ по данным цитологического исследования показанием к операции были узловой зоб больших размеров со смещением органов шеи.

Забор материала проводился на дооперационном этапе при выполнении ТАБ узловых образований ЩЖ под ультразвуковым контролем. Далее выполнялось молекулярно-генетическое исследование на наличие в материале пункционной биопсии мутации V600E гена BRAF. Окончательная верификация диагноза проводилась по данным гистологического исследования.

Преаналитический этап

Пункционная тонкоигольная биопсия проводилась по стандартной технологии под контролем ультразвукового исследования. Материал помещался в пробирки со стабилизирующей средой «EverFresh RNA» фирмы «Силекс» (Москва, Россия).

Полученные образцы хранились при температуре 4°С до исследования (не более 2 дней).

Выделение ДНК

ДНК выделяли из ткани щитовидной железы, используя набор «ДНК — ГС» (ДНК-Технология, Россия) согласно прилагаемой инструкции. В результате получали 100 мкл водного раствора, содержащего от 3 до 10 мкг ДНК. После выделения образцы ДНК хранились при температуре –20°С до исследования.

Проведение ПЦР анализа

Амплификация проводилась на приборе «Терцик» (ДНК-технология, Россия) по стандартной двухпраймерной схеме в конечном объеме 10 мкл. Реакционная смесь содержала: 2 мкл ДНК, 14 рМол каждого праймера, смесь дНТФ в конечной концентрации 240 мкМол и 2,5 единицы термостабильной Taq ДНК-полимеразы (Helicon, Россия) в стандартном ПЦР буфере с содержанием Mg^{2+} 15 мМол. Последовательности используемых праймеров: обратный праймер (общий для дикого и мутантного аллелей гена BRAF) «RP-BRAF» 5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3' и 2 прямых праймера: «FW-BRAF» 5'-TAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGT-3' для дикого типа и «FM-BRAF» 5'-GGTGATTTTGGTCTAGCTACAAA-3' для мутантного типа гена [32].

Программа амплификации состояла из начальной денатурации (96°С, 3 мин), 40 циклов, включавших денатурацию (94°С, 20 с), отжиг праймеров (61°С, 30 с) и элонгацию (72°С, 40 с), и заключительной элонгации (72°С, 8 мин).

ПЦР продукт без предварительной обработки наносился на 2% агарозный гель. Электрофорез проводился в стандартном трис-ЭДТА-боратном буфере при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 20 минут. Визуализация проводилась с помощью водного раствора бромистого этидия. Фотографирование электрофореграммы проводилось в УФ свете на трансиллюминаторе (254 нм).

Оценка результатов исследования

Качественная оценка аналитических характеристик проводилась путем исследования данных электрофореграммы продуктов амплификации. Каждая проба оценивалась по наличию электрофоретического сигнала в двух дорожках: дорожка № 1 (амплификация с праймерами для «дикого» и мутантного типов гена BRAF) и дорожка № 2 (амплификация с праймерами только для

мутантного типа гена BRAF). Наличие электрофоретического сигнала в дорожке № 1 являлось контролем метода. Наличие сигнала в дорожке № 2 свидетельствовало о наличии данной мутации в исследуемом образце (рис. 1).

Результаты выявления мутации V600E гена BRAF в материале аспирационных биоптатов и сопоставление с диагнозами, сделанными по данным морфологического исследования на послеоперационном материале, были оценены по следующим критериям (21):

- предсказательная ценность положительного теста;
- чувствительность теста;
- предсказательная ценность отрицательного теста;
- специфичность теста;
- диагностическая точность метода.

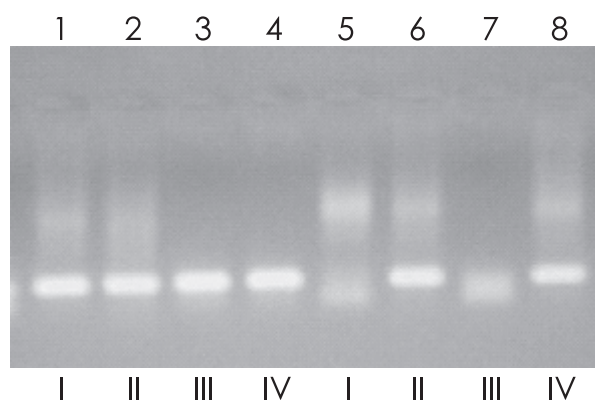


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации

Примечание: Дорожки 1, 2, 3, 4 — «дикий» и мутантный типы гена BRAF. У всех 4 пациентов (I — IV) присутствует дикий тип гена BRAF (внутренний контроль).

Дорожки 5, 6, 7, 8 — мутантный тип гена BRAF. Пациенты II и IV — положительные по мутации в гене BRAF, пациенты I и III — отрицательные по мутации в гене BRAF.

Результаты исследования

Всем прооперированным больным было выполнено гистологическое исследование операционного материала, по результатам которого проведен сравнительный анализ данных цитологического и гистологического исследований. У всех пациентов с заведомо доброкачественными заболеваниями ЩЖ (9 человек) дооперационный цитологический диагноз «узловой коллоидный зоб» был подтвержден при гистологическом исследовании. Цитологический диагноз «папиллярный рак» был подтвержден в 100% случаев при гистологическом исследовании у пациентов исследуемой группы. Интересным оказалось распределение верифицированных при гистологическом исследовании диагнозов в группе пациентов с неопределенным диагнозом по данным ТАБ. У восьми пациентов диагностирована фолликулярная аденома, у одного — фолликулярный рак (табл. 2).

Таблица 2

Результаты планового гистологического исследования у больных контрольной и исследуемой групп

Цитологическое заключение	Кол-во	Окончательный гистологический диагноз	Кол-во
Узловой коллоидный зоб	9	Узловой коллоидный зоб	9
Папиллярный рак	12	Папиллярный рак	12
Фолликулярная опухоль	9	Фолликулярная аденома	8
		Фолликулярный рак	1
Всего	30	Узловой коллоидный зоб	9
		Фолликулярная аденома	8
		Папиллярный рак	12
		Фолликулярный рак	1

Результаты генетического исследования и их обсуждение

В работах ряда зарубежных исследователей описывается мутация V600E в 15 экзоне гена BRAF (BRAFV600E), как наиболее часто встречающаяся при папиллярном раке ЩЖ [16, 25]. Наличие данной мутации ведет к дестабилизации в RAF-киназном гене, что в конечном итоге приводит к активации MAP-киназного пути и повышению митотической и пролиферативной активности клетки.

При исследовании гистологического материала от больных, прооперированных по поводу рака ЩЖ, наличие BRAFV600E мутации определялось с частотой 38–69% [5, 14, 18, 20, 29]. Ряд авторов связывают наличие данной мутации в опухоли с большей агрессивностью процесса (наличие регионарных метастазов, развитие рецидива в течение 6 лет) [14]. Также в последнее время появился ряд исследований с длительным отдаленным наблюдением пациентов (до 15–20 лет), в таких исследованиях была выявлена положительная корреляция между наличием BRAFV600E мутации и более неблагоприятным прогнозом течения заболевания [8]. По данным авторов, эта мутация также ассоциирована с большей частотой экстрагитроидной инвазии, поражением регионарных лимфоузлов и наличием отдаленных метастазов [14, 19]. Авторы этих исследований делают вывод о необходимости более длительного (более 5 лет) и тщательного наблюдения пациентов, у которых выявлена BRAFV600E мутация [23, 30].

Однако существуют и другие исследования, авторы которых не выявляют статистически значимой корреляции между этой мутацией и агрессивностью течения процесса [20]. Небольшое количество работ опровергают наличие связи между BRAFV600E мутацией и прогнозом [5, 10]. Также рядом авторов отмечается зависимость встречаемости BRAFV600E мутации от возраста пациента. По данным V. Trovisco и соавт. [29], средний возраст таких пациентов составляет 46,7 лет, а пациентов без мутации — 29,5 лет.

Ряд статей посвящен исследованию возможности определения BRAFV600E мутации в материале ТАБ при неясном либо неинформативном заключении цитологического исследования. На дооперационном этапе правильный диагноз удалось поставить 76% пациентов [18]. При этом определялся только один ложноположительный результат. Чувствительность определения данной мутации в материале ТАБ составила 83%, а специфичность — 96% [18].

Таким образом, определение BRAFV600E мутации является перспективным исследованием для диагностики рака щитовидной железы на дооперационном этапе. В ходе исследования нами были получены следующие результаты — см. таблицу 3.

В группе пациентов с дооперационным цитологическим диагнозом «коллоидный зоб» мутантного типа гена BRAF не было выявлено ни в одном случае, что полностью совпало с данными планового гистологического послеоперационного исследования, при котором был поставлен диагноз узлового коллоидного зоба.

Таблица 3

Выявление мутации гена BRAFV600E

Цитологическое заключение	Кол-во	Окончательный гистологический диагноз	Кол-во	BRAF-мутация есть	BRAF-мутации нет
Узловой коллоидный зоб	9	Узловой коллоидный зоб	9	0	9
Папиллярный рак	12	Папиллярный рак	12	10	2
Фолликулярная опухоль	9	Фолликулярная аденома	8	0	8
		Фолликулярный рак	1	1	0
Всего	30		30	11	19

В группе пациентов с бесспорным диагнозом по результатам цитологического исследования «папиллярный рак» во всех случаях данный диагноз был подтвержден гистологическим исследованием, однако мутантный тип гена BRAF определялся в 10 образцах, а в 2 случаях мутантный тип гена BRAF не определялся.

Большой интерес представляет третья группа, в которую вошли пациенты с цитологическим диагнозом «фолликулярная опухоль». По данным гистологической оценки препаратов у 8 пациентов был поставлен окончательный диагноз фолликулярная аденома, и у одного — фолликулярный рак. Мутантный тип гена BRAF не определялся ни в одном из образцов, взятых у пациентов с фолликулярной аденомой, однако в образце, взятом у пациента с фолликулярным раком, был обнаружен мутантный тип гена BRAF.

Таким образом, данное исследование позволяет у ряда пациентов ставить показания к оперативному вмешательству по поводу рака ЩЖ с соответствующим объемом оперативного вмешательства и соблюдением онкологических принципов. Отсутствие данной мутации позволяет ограничить показания к оперативному вмешательству с диагностической целью. Однако данное утверждение требует дальнейшего подтверждения, в связи с небольшим количеством исследованных пациентов.

Из 12 пациентов с папиллярным раком щитовидной железы мутантный тип гена BRAF определялся в 10 случаях (83,3%) и не определялся только у 2 пациентов (16,7%). Из 18 пациентов с доброкачественными заболеваниями щитовидной железы (узловой коллоидный зоб и фолликулярная аденома щитовидной железы) мутантный тип гена BRAF не определялся ни в одном случае.

В задачи нашего исследования входило выявление мутации V600E гена BRAF в опухолевых клетках больных с узловыми образованиями щитовидной железы. Мы провели изучение корреляции полученных данных с морфологическими формами опухоли, а также провели оценку значения изучаемых маркеров в диагностике высокодифференцированного рака ЩЖ на дооперационном этапе. Критерии достоверности были вычислены по общепринятой методике [21] (табл. 4).

Таким образом, чувствительность данного метода исследования составила 85%, специфичность — 100% и, соответственно, диагностическая ценность составила 93%. По данным нашего исследования, наличие в образцах мутантного типа гена BRAF с вероятностью 100% свидетельствует о злокачественности процесса, а отсутствие данной мутации характерно для доброкачественных заболеваний. Значительный интерес представляет группа пациентов с диагнозом «фолликулярная опухоль», у которых оперативное вмешательство выполняется с диагностической целью. Определение мутантного типа гена BRAF может быть использовано для уточ-

нения диагноза на дооперационном этапе и определения дальнейшей тактики лечения пациентов данной группы.

Таблица 4

Критерии достоверности метода выявления мутации V600E гена BRAF у пациентов с подозрением на рак щитовидной железы

Параметры	BRAF-мутация
Предсказательная ценность положительного теста	100%
Чувствительность теста	85%
Предсказательная ценность отрицательного теста	90%
Специфичность теста	100%
Диагностическая точность метода	93%

Полученные в настоящей работе данные показывают, что, несмотря на относительно невысокую чувствительность, выявление BRAFV600E мутации имеет высокую специфичность [11]. Следует отметить, что ТАБ с последующим цитологическим исследованием аспирата имеет сходную чувствительность, но низкую специфичность в выявлении злокачественных опухолей, а именно, фолликулярного рака. Используя в рутинной практике более простой, экономически выгодный метод цитологического исследования в качестве скрининга, при выявлении подозрительных результатов (подозрительные на рак и неопределенные результаты) возможно использование более высокотехнологичного и специфичного метода генетического анализа.

Таким образом, наличие мутации V600E гена BRAF является диагностическим маркером высокодифференцированного рака щитовидной железы. Выявление мутации гена BRAFV600E может быть использовано в качестве дополнительного метода дооперационной диагностики высокодифференцированного рака щитовидной железы.

Литература

1. Валдина Е.А. Заболевания щитовидной железы: Руководство. — 3-е изд. — СПб., Питер, 2006. — 368 с.
2. Гринёва Е.Н. Узловые образования щитовидной железы. Диагностика и врачебная тактика // Проблемы эндокринологии. — 2003, том 49, № 6. — С. 59–62.
3. Пачес А.И., Пропп Р.М. Рак щитовидной железы. — Москва, Центр внедр. достиж. науки и техники, 1995. — С. 375.
4. Рентгенофлуоресцентный метод в дифференциальной диагностике заболеваний щитовидной железы // Проблемы эндокринологии. — 1997, том 43, № 3. — С. 38–42.

5. Brzezińska E., Pastuszek-Lewandoska D., Wojciechowska K., Migdalska-Sek M., Cyniak-Magierska A., Nawrot E., Lewiński A. Investigation of V600E BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in the Polish population // *Neuro. Endocrinol. Lett.*, 2007, aug.; 28(4): 351–9.
6. Burch H.B. Evaluation and management of the solid thyroid nodule // *Endocrinol. Metab. Clin. North. Amer.*, 1995. — Vol. 24, N 4. — P. 663–698.
7. Cibas E.S., Ducatmann B.S. Cytology. Diagnosis principles and clinical correlates. WB Saunders company. A division of Harcourt Brace Company. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. — 1996. — P. 217–242.
8. David Viola, Cristina Romei, Agnese Biagini, Laura Agate, Eleonora Molinaro, Raffaele Ciampi, Giulia Renzini, Riccardo Giannini, Clara Ugolini, Piero Berti, Aldo Pinchera & Rossella Elisei. Prognostic significance of BRAF mutation in patients affected by papillary thyroid carcinoma with a follow up of 20 years // *J. Clin. Endocrinology*, 2007, 75(4): 325–4.
9. Frasca F., Nucera C., Pellegriti G., Gangemi P., Attard M., Stella M., Loda M., Vella V., Giordano C., Trimarchi F., Mazzone E., Belliomi A. and Vigneri R. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer // *Endocr. Relat. Cancer*, 2008, 15(1): 191–205.
10. Fugazzola L., Puxeddu E., Avenia N., Romei C., Cirello V. Correlation between BRAFV600E mutation and clinic-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italy study and review of the literature // *Endocr. Relat. Cancer*, 2006, 13(2): 455–64.
11. Gharib H. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: advantages, limitations, and affect // *Meyo. Clin. Proc.*, 1994. — V. 69. — P. 44–49.
12. Hundahl S.A., Fleming I.D., Fremgen A.M., Menck H.R. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer research* 63: 1454–1457, 1998.
13. Jo Y.S., Huang S., Kim Y.J., Lee I.S., Kim S.S. Diagnostic value of pyrosequencing for the BRAF V600E mutation in ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy samples of thyroid incidentalomas // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2009, 70(1): 139–44.
14. Kebebew E., Weng J., Bauer J., Ranvier G., Clark O.H., Duh Q.Y., Shih D., Bastian B., Griffin A. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer // *Ann. Surg.*, 2007, 246(3): 466–70.
15. Kim T.Y., Kim W.B., Rhee Y.S., Song J.Y. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2006, 65(3): 364–8.
16. Kimura E.T., Nikiforova M.N., Zhu Z., Knauf J.A., Nikiforov Y.E., Fagin J.A. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma // *Cancer Res.*, 2003, 63: 1454–1457.
17. Kimura E.T., Nikiforova M.N., Zhu Z., Knauf J.A., Nikiforov Y.E., Fagin J.A. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma // *Cancer Res.*, 2003, 63: 1454–1457.
18. Ki-wook Chung, Sun Kyung Yang and al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule cytopathology diagnosis, especially in BRAFV600E mutation-prevalent area // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2006, 65(5): 660–6.
19. Lee J.H., Lee E.S., Kim Y.S. Clinicopathologic significance of BRAF V600V mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis // *American Cancer Society*, 2007.
20. Leslie R. Rowe, Brandon G. Bentz, Joel S. Bentz. Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules // *CytoJournal*, 2006, 3: 10.
21. Linn S. A new conceptual approach to teaching the interpretation of clinical tests // *Journal of Statistics Education*, 2004. — Vol. 12, N 3.
22. Maria Rosaria Sapio, Daniela Posca, Angelo Raggioli, Anna Guerra and al. Detection of RET/PTC, TRK and BRAF mutations in preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytological findings // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2007, 66(5): 678–83.
23. Mingzhao Xing, Ralph P. Tufano, Anthony P. Tufaro, Shehzad Basaria, Marge Ewertz, Eli Rosenbaum, Patrick J. Byrne, James Wang, David Sidransky and Paul W. Detection of BRAF Mutation on Fine Needle Aspiration Biopsy Specimens: A New Diagnostic Tool for Papillary Thyroid Cancer // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, Jun.; 89(6): 2867–72.
24. Minireview: RET/PTC Rearrangements and BRAF Mutations in Thyroid Tumorigenesis. Raffaele Ciampi and Yuri E. Nikiforov; *Endocrinology* 148(3): 936–941; October 31, 2008.
25. Namba H., Nakashima M., Hayashi T., Hayashida N., Maeda S., Ohtsuru A., Saenko V.A., Kanematsu T., Yamashita S. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2003, 88: 4393–4397.
26. Noguchi Masaktini, Kinami Shinichi, Konoshita Kazuo et al. Risk of bilateral cervical lymph node metastasis in papillary thyroid cancer // *J. Surg. Oncol.*, 1993, 52(3): 155.
27. Rossella Elisei, Clara Ugolini, David Viola, Cristiana Lupi, Agnese Biagini, Riccardo Giannini. BRAFV600E mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study // *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 2008.
28. Tan G.H., Gharib H. Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging // *Annals. Intern. Med.*, 1997, 126(3): 226–231.
29. Trovisco V., Soares P., Preto A., de Castro I.V., Lima J., Castro P., Máximo V., Botelho T., Moreira S., Meireles A.M., Magalhães J., Abrosimov A., Cameselle-Teijeiro J., Sobrinho-Simões M. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness // *Virchows Arch.*, 2005, 446(6): 589–95.
30. Ugolini Clara, Giannini Riccardo, LUPI Cristiana. Presence of BRAF V600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid* ISSN 1050–7256, 2007, vol. 17, N 5, pp. 381–388.
31. Woffendin H., Garnett M.J., Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Floyd Y., Gray K., Hall S., Hawes R., Hughes J., Kosmidou V., Menzies A., Mould C., Parker A., Stevens C., Watt S., Hooper S., Wilson R., Jayatilake H., Gusterson B.A., Cooper C., Shipley J., Hargrave D., Pritchard-Jones K., Maitland N., Chenevix-Trench G., Riggins G.J., Bigner D.D., Palmieri G., Cossu A., Flanagan A., Nicholson A., Ho J.W., Leung S.Y., Yuen S.T., Weber B.L., Seigler H.F., Darrow T.L., Paterson H., Marais R., Marshall C.J., Wooster R., Stratton M.R., Futreal P.A. Mutations of the BRAF gene in human cancer // *Nature.*, 2002, 417: 949–954.
32. Xiulong Xu., Roderick M. Quiros, Paolo Gattuso, Kenneth B. Ain, and Richard A. Prinz; High Prevalence of BRAF Gene Mutation in Papillary Thyroid Carcinomas and Thyroid Tumor Cell Lines. *CANCER RESEARCH* 63, 4561–4567, 2003, August 1.

АКТУАЛЬНОСТЬ, ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ОЦЕНКИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ

С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА, В.В. МАКАРЕНКО

ГОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет Росздрава», Барнаул

Резюме. Обзор научной литературы, касающейся вопросов лабораторной оценки эндотелиальной дисфункции, повреждения и регенерации эндотелия при артериальной гипертензии и атеросклерозе. Аргументируется актуальность и перспективность внедрения в лабораторную практику группы лабораторных маркеров, наиболее часто применяемых в кардиологических научных исследованиях. Анализируются данные о факторах, влияющих на чувствительность и специфичность этих маркеров. Формулируются вопросы, выяснение которых, по мнению авторов, должно предшествовать внедрению рассматриваемых маркеров дисфункции эндотелия в лабораторную практику.

Ключевые слова: дисфункция эндотелия, артериальная гипертензия, атеросклероз, лабораторные тесты.

ACTUALITY, PERSPECTIVES AND PROBLEMS OF LABORATORY EVALUATION OF ENDOTHELIAL DISFUNCTION IN CHRONIC DISEASES OF CIRCULATION SYSTEM

S.A. ELCHANINOVA, V.V. MAKARENKO

State Federal Institution of Higher Professional Education «Altai State Medical University, Federal Agency for Health Care and Social Development», Barnaul

Summary. Review of scientific publications concerning the problems of laboratory evaluation of endothelial dysfunction, injury and regeneration of endothelium in arterial hypertension and atherosclerosis is given. The actuality and perspectives of the use in routine laboratory practice of tests, which are commonly used in cardiologic scientific investigations, are discussed. Results concerning factors, influencing sensitivity and specificity of these markers, are analyzed. Problems, necessary to be solved before the introduction of these tests to laboratory practice, are stated.

Key words: endothelial dysfunction, arterial hypertension, atherosclerosis, laboratory diagnosis.

В последние десятилетия установлено, что нарушение структуры и функций эндотелия вовлечены в патогенез большого числа болезней и синдромов, таких как сахарный диабет, венозная недостаточность, аутоиммунные заболевания соединительной ткани, сепсис и другие [64,17]. Наиболее изучены механизмы развития дисфункции эндотелия (ДЭ) и его повреждения при таких широко распространенных и часто сочетающихся хронических заболеваниях системы кровообращения, как атеросклероз и артериальная гипертензия. В свете современных научных данных состояние эндотелия рассматривается как интегральный показатель эффектов множества факторов кардиоваскулярного риска и критично не только для процессов инициации и прогрессирования этих заболеваний, но и для перехода их стабильного клинического течения в нестабильное [22, 43]. В связи с этим ДЭ признана клиническими специалистами основной мишенью при первичной профилактике, а также при лечении атеросклероза и артериальной гипертензии [3, 4, 5, 7, 43, 22]. Однако как диагностика, так и мониторинг этих «болезней эндотелия» в широкой

клинической практике в настоящее время основаны, главным образом, на оценке клинических симптомов, результатов функциональных нагрузочных проб, гемодинамических параметров, а также морфологических нарушений в отдельных кровеносных сосудах. Использование лабораторных тестов («высокочувствительный» С-реактивный белок, липидный профиль, гомоцистеин и др.) ограничивается выявлением и мониторингом коррекции кардиоваскулярных факторов риска.

Следует отметить, что для оценки состояния эндотелия в клинических исследованиях широко используются вазомоторные пробы, которые являются клиническими аналогами экспериментов, выявивших сниженную вазодилатацию, а в отдельных случаях — парадоксальную вазоконстрикцию, пораженных атеросклерозом изолированных сосудов в ответ на ацетилхолин [47]. Первоначально проба проводилась на коронарных артериях и включала локальное введение ацетилхолина с измерением диаметра сосудов коронарной ангиографией, в настоящее время она проводится на плечевой артерии [21, 25, 47]. В современном варианте ее прове-

дение включает фармакологическое (ацетилхолином) и/или физиологическое (вазокомпрессией) стимулирование высвобождения оксида азота эндотелием с плевтизмографической или доплерографической оценкой вазодилатации и часто сочетается с измерением эндотелийнезависимой вазодилатации, например, в ответ на нитроглицерин [9, 20]. Некоторыми исследователями пробы на эндотелийзависимую вазодилатацию рассматриваются как «золотой» стандарт оценки состояния эндотелия в клинических исследованиях [23]. Однако признается, что технические сложности выполнения, недостаточная стандартизация, значительное индивидуальное и межиндивидуальное варьирование результатов, обусловленное влиянием множества факторов, ограничивают широкое использование этих проб в клинической практике [20, 52]. Кроме того, с помощью этих проб возможно оценить лишь вазотоническую функцию эндотелия и выявить ее нарушения в плечевой артерии, которые, учитывая характер распространенности атеросклеротических повреждений, не всегда надежно отражают изменения в других артериях. В связи с этим актуально внедрение в клиническую практику лабораторных маркеров состояния эндотелия, которые могут дать клиницисту объективную информацию о комплексе патобиохимических нарушений в сосудистой стенке в разные периоды развития болезни и в процессе ее лечения.

Роль эндотелия в поддержании гомеостаза кровеносных сосудов

К настоящему времени установлены определенные закономерности функционирования эндотелия в норме, а также при развитии артериальной гипертензии и атеросклероза, которые нельзя не учитывать при разработке и использовании лабораторных тестов. Эндотелиоциты синтезируют и секретируют большое число эндотелиальных факторов — биологически активных веществ, оказывающих пара- и аутокринные эффекты на клетки сосудистой стенки, а также форменные элементы крови и некоторые компоненты плазмы (табл. 1, 2). Продукция эндотелием этих сигнальных молекул, в свою очередь, регулируется рецептор-опосредованным механизмом, нейроэндокринными и локальными факторами — ацетилхолином, ангиотензином II, изменением скорости кровотока, гипоксией и другими [43, 48].

Многие эндотелиальные факторы оказывают множественное действие на сосудистую стенку. К примеру, оксид азота оказывает не только вазодилатирующий, но и антимитогенный, а также противотромботический эффекты [18]. Выделяют группы эндотелиальных факторов с противоположно направленными влияниями на метаболизм и функционирование близлежащих клеток [49]. Так, эндотелий продуцирует вазодилататоры и вазоконстрикторы (табл. 1). Вследствие влияний эндо-

Таблица 1

Основные вазоактивные эндотелиальные факторы [18, 35]

Фактор	Основной эффект	Другие эффекты	Секреция/Основные регуляторы
NO (оксид азота)	Вазодилатация	Поддержание базального сосудистого тонуса; подавление адгезии лейкоцитов и тромбоцитов; поддержание тромбоцитов в неагрегированном состоянии; подавление миграции и пролиферации гладкомышечных клеток; подавляет апоптоз эндотелиоцитов	Паракринно/ Конститутивно и индуцируется тромбином, АДФ, брадикинином, изменением скорости кровотока, цитокинами
PGI ₂ (простациклин)	Вазодилатация	Торможение агрегации тромбоцитов	Паракринно/ Индуцируется в местах нарушений структуры сосудистой стенки
O ₂ – (супероксид)	Вазоконстрикция (инактивация оксида азота)	Усиление адгезии лейкоцитов; адгезии и агрегации тромбоцитов; усиление миграции и пролиферации гладкомышечных клеток; проапоптотный эффект на эндотелиоциты	Паракринно/ Индуцируется гипоксией, изменением скорости кровотока и ишемией
ЕТ-1 (эндотелин-1)	Вазоконстрикция	Митоген для гладкомышечных клеток; модуляция эффектов многих факторов	Паракринно/ Индуцируется гипоксией, изменением скорости кровотока и ишемией
Ангиотензин II	Вазоконстрикция	Митоген для гладкомышечных клеток и фибробластов; индуктор апоптоза эндотелиоцитов; стимулирует миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток	Паракринно/ Индуцируется гипоксией, изменением скорости кровотока и ишемией

Эндотелиальные факторы и компоненты, участвующие в регуляции гемостаза [18, 29]

	Антитромботические	Протромботические
Участки связывания компонентов плазменной системы гемостаза	Гликозаминогликаны/антитромбин III. Тромбомодулин. Ингибитор тканевого фактора	Участки связывания фибрина, фIX, Ха, фX, Ха, фXII, калликреина. Тканевой фактор. Рецептор тромбина. Рецептор протеина C/активированного протеина C
Компоненты, влияющие на тромбоциты	PGI ₂ NO АДФаза	Фактор Виллебранда. Активирующий тромбоциты фактор Фибриноген фV, фX
Фибринолитические факторы	Тканевой активатор плазминогена. Участки связывания плазминогена. Аннексин	Ингибитор активатора плазминогена. Ингибитор протеина C. Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза
Вазомоторные факторы	NO, PGI ₂	Эндотелин-1, TA ₂

телиальных факторов-антагонистов с множественным действием изменения тонуса и структуры кровеносных сосудов в физиологических условиях, а также при их нарушениях взаимосвязаны [18, 45]. Следует отметить, что при усилении продукции эндотелиальных факторов — эндотелина-1, супероксидного радикала и ряда других, характер их влияний на клетки-мишени может изменяться вследствие включения иных молекулярных механизмов, участия других типов рецепторов [35, 65]. В физиологических ситуациях доминирует продукция эндотелиоцитами вазодилатирующих, антимиотогенных и противотромбогенных факторов, эффект которых адаптивно модулируется факторами-антагонистами при их слабовыраженном и/или эпизодическом возрастании продукции в сосудистой стенке [53].

Активация, дисфункция и повреждение эндотелия при атеросклерозе и артериальной гипертензии

При длительном и/или выраженном воздействии неблагоприятных факторов развивается устойчивый дисбаланс продукции эндотелиальных сигнальных молекул, проявляющийся констрикцией резистивных сосудов, их ремоделированием при артериальной гипертензии, персистированием воспаления с формированием бляшек, тромбообразованием при атеросклерозе [18]. Такая трансформация адаптивной реакции эндотелия в дизадаптивную в сложившейся терминологии описывается как активация эндотелия, которая при определенных условиях завершается эндотелиальной дисфункцией.

Активация эндотелия представляется как переключение фенотипа относительного покоя на фенотип защиты [23]. При этом многие факторы кардиоваскулярного риска активируют молекулярные механизмы, ведущие к экспрессии эндотелиоцитами хемокинов, адгезивных молекул и других цитокинов, которые ини-

цируют формирование атеросклеротического повреждения и участвуют в его прогрессировании и дестабилизации [37]. Адгезию лейкоцитов и их миграцию в субэндотелий опосредуют экспрессируемые на поверхности эндотелиоцитов молекулы адгезии, из которых наиболее изучены молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (Vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1), молекула межклеточной адгезии 1 типа (Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) и Е-селектин [27, 60]. Известно, что селектины участвуют в начальной стадии взаимодействия лейкоцитов с эндотелием, а VCAM-1 и ICAM-1 обеспечивают более прочное связывание этих клеток и трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов. Помимо мембранных форм существуют и циркулирующие в плазме крови формы молекул адгезии, образующиеся в результате протеолитического высвобождения мембранных форм молекул адгезии при усилении их биосинтеза активированными эндотелиоцитами [58, 60].

Пусковым механизмом активации эндотелия, этой комплексной адаптивной реакции, является переключение от опосредованных оксидом азота клеточных процессов к процессам, опосредованным супероксидом и образующейся из него под действием супероксиддисмутазы перекисью водорода, которые реагируют с остатками цистина в эффекторных внутриклеточных белках и изменяют/нарушают их функционирование [56]. Это ведет к комплексу биохимических изменений в эндотелиоцитах, включающих фосфорилирование факторов транскрипции, индукцию транскрипции различных генов, активацию протеаз [30, 36].

Под ДЭ в узком смысле понимают ослабление эндотелиальной базальной или стимулированной продукции вазодилататоров, прежде всего оксида азота [41]. Такое определение ДЭ было сформулировано в начале восьмидесятых годов прошлого столетия, вскоре после раскрытия роли оксида азота в регуляции тонуса резистивных

сосудов. Позже были получены многочисленные данные об участии эндотелия не только в вазотонической, но и других функциях сосудистой системы. Поэтому в более широком понимании ДЭ — это состояние эндотелия сосудов, сопровождающееся нарушением вазотонической, ремоделирующей, противовоспалительной и антикоагулянтной функций [18, 33]. Спектр этих нарушений, выраженность каждого из них, а также хронология возникновения, динамика прогрессирования различаются в зависимости от нозологической формы патологии. Так, при артериальной гипертензии ведущим является ослабление вазодилатирующей функции эндотелия резистивных сосудов, тогда как при атеросклерозе — повреждение эндотелиоцитов с развитием воспалительной реакции. Однако, в целом, как при атеросклерозе, так и при часто сочетающейся с ним и вовлеченной в его развитие артериальной гипертензии могут быть выявлены все эти «симптомы» ДЭ.

Длительное и/или повторяющееся действие факторов кардиоваскулярного риска может в конечном счете привести к тому, что эндотелий изменяется не только функционально, но и структурно. При этом отмечается усиление не только гибели эндотелиоцитов путем некроза, но и ослабление межклеточной интеграции в эндотелии, ускорение апоптоза и увеличение циркулирующих в крови эндотелиоцитов [76].

Лабораторная оценка состояния эндотелия: перспективы и проблемы

Кандидатами в лабораторные маркеры состояния эндотелия можно считать многие вещества, частицы эндотелиального происхождения, а также клетки-предшественники эндотелиоцитов, циркулирующие в крови в норме и/или при патологии. Условно все эти субстанции можно разделить на несколько групп: маркеры нарушения вазоактивной функции эндотелия, маркеры повреждения и репарации эндотелия, маркеры тромбогенных реакций эндотелия, и метаболиты, ассоциированные с активацией эндотелия и воспалением в сосудистой стенке. Измерение уровня многих из циркулирующих субстанций эндотелиального происхождения в клинических лабораториях дорого и/или технически трудно. Кроме того, их измерение имеет весьма ограниченное значение в индивидуальной оценке состояния эндотелия из-за значительного биологического и аналитического варьирования и поэтому проводится лишь в научных исследованиях, которые могут дать новую информацию, касающуюся механизмов развития и выраженности ЭД в популяции [63].

Это относится, в частности, к лабораторным показателям интенсивности эндотелиального синтеза оксида азота. Короткий период жизни оксида азота не позволяет определять его методами, доступными клиническим лабораториям. Большая часть оксида азота в организме

окисляется в нитрит и нитрат, суммарное содержание которых можно измерить фотометрически после превращения нитрата в нитрит. Однако уровень нитрита, так же как и уровень нитрозилированных белков в плазме крови, лишь частично, а, следовательно, недостаточно надежно отражает продукцию оксида азота эндотелием. Эти метаболиты могут образовываться из других азотсодержащих веществ, включая компоненты пищи, а также из оксида азота неэндотелиального происхождения [55].

В эксперименте на животных и в клинических исследованиях показано, что со снижением биоактивности оксида азота ассоциируется повышенный уровень асимметричного диметиларгинина — эндогенного конкурентного ингибитора NO-синтазы [46]. Повышенный уровень этого метаболита выявлен у пациентов, имеющих такие факторы риска атеросклероза, как дислипидемия и артериальная гипертензия, а также у пациентов с сахарным диабетом и почечной недостаточностью [13]. Это повышение, частично, обусловлено сниженной активностью фермента, разрушающего асимметричный диметиларгинин, — диметиларгинин-диметиламиногидролазы, которая имеет высокую чувствительность к нарушению оксидативного статуса клетки, сопровождающему факторы риска атеросклероза и воспаление. Поскольку уровень асимметричного диметиларгинина связан с доклиническими проявлениями и цереброваскулярными осложнениями атеросклероза, его измерение может быть полезно для оценки состояния эндотелия и потенциально служить маркером риска в клинической практике [12]. Однако в настоящее время его определение представляет определенные трудности и достаточно дорого.

Эндотелины (ЭТ) — это группа пептидов (ЭТ-1, ЭТ-2, ЭТ-3), участвующих в формировании эндотелий-зависимого тонуса сосудов, наиболее мощные из известных пептидных вазоконстрикторов. В отличие от ЭТ-2 и ЭТ-3, продукция ЭТ-1 более специфична для эндотелиоцитов [44]. В плазме крови больных атеросклерозом и артериальной гипертензией ЭТ-1 присутствует в повышенных, однако низких, концентрациях [1], что в сочетании с коротким периодом полураспада пептида (около 1–2 мин) негативно отражается на аналитической точности его определения. Кроме того, следует учитывать, что источником ЭТ-1 плазмы крови является не только эндотелий, но и кардиомиоциты, моноциты, мезангиальные клетки клубочков почек [44].

Образование ЭТ из цитоплазматического предшественника — big-ЭТ осуществляет мембранная металлопротеиназа — эндотелин-превращающий фермент. Большая стабильность молекулы big-ЭТ-1 в плазме крови по сравнению с ЭТ-1 позволяет прогнозировать возможность его использования в качестве маркера цитолиза эндотелиоцитов [1]. Однако при этом необходимо

учитывать зависимость плазменного уровня big-ЭТ-1 от скорости биосинтеза этого пептида эндотелием.

Понимание того, что функция эндотелия отражает баланс между его повреждением и репарацией, послужило стимулом для разработки лабораторных маркеров этих процессов. В качестве индикаторов повреждения эндотелия рассматриваются эндотелиальные микрочастицы, образованные активированными или апоптотическими эндотелиоцитами, а также циркулирующие эндотелиоциты [14, 50]. Повышенный уровень циркулирующих эндотелиоцитов у пациентов с клиническими проявлениями атеросклероза и воспалением сосудов позволяет предполагать прямую связь между количеством этих клеток в крови и обширностью повреждений эндотелия [34]. Циркулирующие эндотелиоциты, которые отделяются от сосудистой стенки при активации и утрате интеграции эндотелия, могут быть дифференцированы от других клеток по размерам и экспрессируемым на поверхности мембраны маркерам. Их уровень в крови определяют методом проточной цитофлуориметрии или комбинацией флуоресцентной микроскопии и селективного выделения с использованием магнитных частиц [32].

Эндотелиальные микрочастицы — это везикулы, менее 1,5 мкм в диаметре, формирующиеся из клеточной мембраны эндотелиоцитов при их активации и апоптозе. Считается, что многие клетки, в частности, клетки крови, при активации и апоптозе способны образовывать микрочастицы [38]. Особенности мембранных маркеров эндотелиальных микрочастиц отражают состояние образовавших их клеток. Показано, что CD31-позитивные эндотелиальные микрочастицы образуются апоптотическими, тогда как CD62E-позитивные — активированными эндотелиоцитами [24, 74].

Функции эндотелиальных микрочастиц не вполне ясны, очевидно, однако, что это не просто маркеры состояния эндотелия. Имеются данные, указывающие на способность эндотелиальных микрочастиц взаимодействовать с плазменной системой гемостаза, активировать лейкоциты и эндотелий через усиление синтеза эйкозаноидов [15, 38]. Установлено, что при эссенциальной артериальной гипертензии уровень эндотелиальных микрочастиц является достаточно чувствительным маркером ДЭ [1]. Исследование эндотелиальных микрочастиц в плазме крови проводят методом проточной цитофлуориметрии с антигенной маркировкой гликопротеидов мембран эндотелиоцитов — CD51, CD31 и других [1]. Поскольку проточная цитофлуориметрия мало доступна большинству лабораторий, методом выбора может стать разрабатываемый иммуноферментный вариант определения эндотелиальных микрочастиц [38].

Интеграция клеток в эндотелии зависит не только от действия повреждающих факторов, но и от способ-

ности эндотелия к репарации. В настоящее время расшифрованы два механизма репарации эндотелия. Зрелые эндотелиальные клетки могут делиться и замещать утраченные или поврежденные соседние клетки [54], однако при обширном повреждении эндотелия этот механизм является недостаточным для репарации эндотелия. Другой механизм включает дифференцировку в эндотелиоциты их циркулирующих клеток-предшественников, образующихся в красном костном мозге [10]. Мобилизация этих клеток из костного мозга в определенной степени зависит от оксида азота и может быть нарушена у пациентов с кардиоваскулярными факторами риска [8, 42, 67]. Дифференцировка этих клеток в эндотелиоциты зависит от их способности к миграции, адгезии и других функциональных характеристик, а также от влияния цитокинов [46, 68]. Циркулирующие клетки-предшественники эндотелиоцитов могут быть идентифицированы по экспрессии характерных поверхностных маркеров, в частности, методом проточной цитофлуориметрии [75]. Однако специфичность таких измерений сомнительна, поскольку многие гемопоэтические клетки, включая и клетки миелоидного ряда, имеют иммунофенотип, во многом сходный с эндотелиальным фенотипом [31]. По мнению некоторых исследователей, необходимо совершенствование метода идентификации циркулирующих клеток-предшественников эндотелиоцитов на основе их специфических фенотипических характеристик, которые включают способность к миграции под действием васкулярного эндотелиального фактора роста (Vascular endothelial growth factor, VEGF), фактора стромальных клеток 1 альфа (Stromal cell-derived factor 1 α , SDF-1 α), способность к адгезии и формированию капилляро-подобных трубочек [75].

В настоящее время активно обсуждается возможность использования в качестве маркеров репарации эндотелия плазменного уровня васкулярного эндотелиального фактора роста и растворимой формы мембранных рецепторов к этому фактору (sFlt) [1, 17, 73]. Васкулярный эндотелиальный фактор роста стимулирует миграцию, пролиферацию эндотелиоцитов и другие процессы, протекающие при ангиогенезе и васкулогенезе [11]. Биосинтез этого гликопротеида осуществляется эндотелиоцитами, а также некоторыми клетками крови, кардиомиоцитами, гепатоцитами, клетками эндометрия и опухолевыми клетками [16]. При этом установлено, что экспрессия гена васкулярного эндотелиального фактора роста в эндотелиоцитах индуцируется гипоксией, а также оксидом азота, некоторыми провоспалительными цитокинами, адреналином [16]. Следует отметить, что концентрация в крови васкулярного эндотелиального фактора роста и растворимой формы мембранных рецепторов к этому фактору может быть повышена не только при ДЭ, но при таких состояниях, сопровождающихся неоваскуляризацией, как регенерация

эндометрия в первую фазу менструального цикла, заживление ран, опухолевые процессы [16].

В качестве маркеров ДЭ, которые отражают развитие воспаления в сосудистой стенке при атеросклерозе, рассматриваются циркулирующие молекулы, опосредующие адгезию лейкоцитов и их миграцию в субэндотелий. К достаточно хорошо изученным молекулам, уровень которых может быть измерен в циркулирующей крови с помощью коммерческих реагентов для иммуноферментного анализа, относятся Е-селектин, растворимые формы молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (Vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) и молекулы межклеточной адгезии 1 типа (Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) [57, 61]. Многие из этих молекул происходят из множества источников, которые не всегда можно идентифицировать. Представляется, что Е-селектин наиболее специфичен для активации эндотелиоцитов. Увеличение его уровня в плазме крови ассоциируется с кардиоваскулярными факторами риска, структурными и функциональными показателями атеросклеротического процесса, а также с неблагоприятным кардиоваскулярным прогнозом [39, 59].

Отметим, что научные данные последних лет позволяют рассматривать С-реактивный белок не только как маркер риска атеросклеротического повреждения артерий и его осложнений, но и как продуцируемый макрофагами и мышечными клетками сосудистой стенки специфический медиатор процессов развития ДЭ [6, 35, 36, 40, 70]. В связи с этим есть вероятность, что последующие исследования в этом направлении позволят интерпретировать повышение уровня этого белка в крови в более тесной связи с ДЭ.

Прокоагулянтные влияния активированного эндотелия могут быть оценены как баланс в плазме крови тканевого активатора плазминогена и его эндогенного ингибитора – ингибитора активатора плазминогена-1 [69]. Кроме того, методом иммуноферментного анализа может быть измерена плазменная концентрация фактора Виллебранда. Этот мембранный гликопротеид, опосредующий адгезию тромбоцитов к сосудистой стенке при ее повреждении, усиленно высвобождается в кровь активированными эндотелиоцитами [62]. Однако при трактовке результатов определения фактора Виллебранда необходимо учитывать возможность его экспрессии не только эндотелиоцитами, но и моноцитами, нейтрофилами, гладкомышечными и другими клетками крови и сосудистой стенки [51, 72]. Более специфичным для эндотелиоцитов, чем фактор Виллебранда, считается мембранный гликопротеид – тромбомодулин, который участвует в поддержании тромборезистентности сосудистой стенки путем специфического связывания и инактивации тромбина, комплекс тромбомодулин–тромбин ускоряет катализируемую тромбином активацию протеина С [26, 27].

Заключение

Не вызывает сомнений то, что лабораторные исследования эндотелиальной функции необходимы для интегральной оценки эффектов факторов риска, ведущих к повреждению эндотелия, его репаративного потенциала, а у пациентов с установленным атеросклеротическим поражением сосудов, артериальной гипертензией – для мониторинга лечения и прогнозирования течения болезни. Лабораторное тестирование эндотелиальной функции полезно также для оценки эффективности новых методов лечения и лекарственных препаратов в кардиологии.

Интенсивные научные исследования, касающиеся патогенеза атеросклероза, артериальной гипертензии, их осложнений, привели к открытию множества биологически активных соединений, компонентов эндотелиального происхождения, содержание которых в крови коррелирует с выраженностью эндотелиальной дисфункции и может служить ее лабораторным индикатором. Использование современных лабораторных технологий и, несомненно, обширный спектр коммерческих реагентов для определения эндотелиальных факторов способствуют быстрому накоплению новых фактов об этих кандидатах в лабораторные маркеры ДЭ. Однако для того чтобы их измерение стало частью медицинской лабораторной практики, необходим всесторонний анализ клинической информативности этих лабораторных тестов и решение ряда вопросов, касающихся аналитической точности их измерения. Практическое использование маркеров затрудняет низкая чувствительность и специфичность многих из них в отношении эндотелиальной дисфункции, отсутствие стандартизованных и/или доступных методов исследования, надежно установленных «порогов принятия клинического решения», рекомендаций по оптимальным профилям маркеров ДЭ. Одним из путей решения этих проблем нового, интенсивно развивающегося и, безусловно, перспективного направления медицинской лабораторной практики может быть мета-анализ результатов выполненных «пилотных» научных исследований и проведение многоцентровых проспективных исследований в различных популяциях.

Литература

1. Ельчанинова С.А., Кореньяк Н.А., Дрягина И.В. и др. Маркеры повреждения эндотелия как возможный критерий эффективности лечения артериальной гипертензии // Клини. Лаб. Диаг., 2007; 2: 40–42.
2. Золовкина А.Г., Ельчанинова С.А., Калачев А.Г. и др. Лабораторный мониторинг эндотелиальной дисфункции при лечении ишемической болезни сердца // Клини. Лаб. Диаг., 2008; 9: 18.
3. Гогин Е.Е. Гипертоническая болезнь / Е.Е. Гогин. — Москва, 1997. — 300 с.

4. Жулев Н.М. Цереброваскулярные заболевания. Профилактика и лечение инсультов / Н.М. Жулев, В.Г. Пустозеров, С.Н. Жулев. — СПб.: Невский диалект, 2002. — 384 с.
5. Оганов Р.Г. Лекарственная терапия сердечно-сосудистых заболеваний: данные доказательной медицины и реальная клиническая практика / Р.Г. Оганов, С.Ю. Марцевич // Российский кардиологический журнал. — 2001. — № 4. — С. 8–11.
6. Титов В.Н. С-реактивный белок — влияние гормонов, физической активности, жирных кислот пищи. Роль в атеротромбозе артерий и диагностическое значение // Клин. Лаб. Диаг., 2008; 7: 3–15.
7. Мареев В.Ю. Хроническая сердечная недостаточность и инсулиннезависимый сахарный диабет: случайная связь или закономерность? / В.Ю. Мареев, Ю.Н. Беленков // Терапевтический архив. — 2003. — № 10. — С. 5–11.
8. Aicher A., Heeschen C., Mildner-Rihm C. et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells // Nat. Med., 2003; 9: 1370–1376.
9. Anderson T.J., Uehata A., Gerhard M.D. et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations // J. Am. Coll. Cardiol., 1995; 26: 1235–1241.
10. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // Science, 1997; 275: 964–967.
11. Beck L. Jr., D'Amore P. Vascular development: Cellular and molecular regulation // Faseb J., 1997; 11: 365.
12. Boger R.H., Maas R., Schulze F., Schwedhelm E. Elevated levels of asymmetric dimethylarginine [ADMA] as a marker of cardiovascular disease and mortality // Clin. Chem. Lab. Med., 2005; 43: 1124–1129.
13. Boger R.H., Sydow K., Borlak J. et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases // Circ. Res., 2000; 87: 99–105.
14. Boulanger C.M., Amabile N., Tedgui A. Circulating Microparticles: A Potential Prognostic Marker for Atherosclerotic Vascular Disease // Hypertension, 2006; 48: 180–186.
15. Boulanger C.M., Scoazec A., Ebrahimian T. et al. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction // Circulation, 2001; 104: 2649–2652.
16. Breier G., Risau W. The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation // Trends Cell. Biol., 1996; 6: 454–461.
17. Cines D.B. Disorders associated with antibodies to endothelial cells // Rev. Infect. Dis., 1989; 11: 705–712.
18. Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A. et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders // Blood, 1998; 91: 3527–3561.
19. Cleland S.J., Sattar N., Petrie J.R. et al. Endothelial dysfunction as a possible link between C-reactive protein levels and cardiovascular disease // Clin. Sci. (Lond); 2000; 98: 531–535.
20. Corretti M.C., Anderson T.J., Benjamin E.J. et al. International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force // J. Am. Coll. Cardiol., 2002; 39: 257–265.
21. Cox D.A., Vita J.A., Treasure C.B. et al. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans // Circulation, 1989; 80: 458–465.
22. Deanfield J. E., Halcox J. P., Rabelink T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance // Circulation, 2007; 115: 1285–1295.
23. Deanfield J.E., Halcox J.P., Rabelink T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance // Circulation, 2007; 115: 1285–1295.
24. Diamant M., Tushuizen M.E., Sturk A., Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? // Eur. J. Clin. Invest., 2004; 34: 392–401.
25. Drexler H., Zeiher A.M. Endothelial function in human coronary arteries in vivo: focus on hypercholesterolemia // Hypertension, 1991; 18: 1190–1199.
26. Esmon C.T. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway // Thromb. Haemost., 1993; 70: 29–34.
27. Esmon C.T., Fukudome K. Cellular regulation of the protein C pathway // Semin. Cell. Biol., 1995; 6: 259–265.
28. Faller D.V. Endothelial cell responses to hypoxic stress // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 1999; 26[1]: 74–84.
29. Feinbloom D., Bauer K.A. Assessment of hemostatic risk factors in predicting arterial thrombotic events // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2005; 25: 2043–2053.
30. Forstermann U., Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace // Circulation, 2006; 113: 1708–1714.
31. Fujiyama S., Amano K., Uehira K. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemo-attractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells // Circ. Res. 2003; 93: 980–989.
32. George F., Brisson C., Poncelet P. et al. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty // Thromb. Haemost., 1992; 67: 147–153.
33. Gimbrone M.A.Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis // Am. J. Cardiol., 1995; 75: 67B–70B.
34. Goon P.K., Boos C.J., Lip G.Y. Circulating endothelial cells: markers of vascular dysfunction // Clin. Lab., 2005; 51: 531–538.
35. Griendling K.K., FitzGerald G.A. Oxidative Stress and Cardiovascular Injury: Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS // Circulation, 2003; 108: 1912–1916.
36. Hamik A., Wang B., Jain M.K. Transcriptional regulators of angiogenesis // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.: 2006; 26: 1936–1947.
37. Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease // N. Engl. J. Med., 2005; 352: 1685–1695.
38. Horstman L.L., Jy W., Jimenez J.J., Ahn Y.S. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction // Frontiers in Bioscience, 2004; 9: 1118–1135.
39. Hwang S.J., Ballantyne C.M., Sharrett A.R. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities [ARIC] study // Circulation, 1997; 16: 96: 4219–4225.

40. Jialal I., Devaraj S., Venugopal S.K. C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? // *Hypertension*, 2004; 44: 6–11.
41. Kuvin J.T., Karas R.H. Clinical utility of endothelial function testing: ready for prime time? // *Circulation*, 2003; 107: 3243–3247.
42. Laufs U., Werner N., Link A. et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis // *Circulation*, 2004; 20: 109: 220–226.
43. Lerman A., Zeiher A.M. Endothelial function: cardiac events // *Circulation*, 2005; 111: 363–368.
44. Levin E.R. Endothelins // *N. Engl. J. Med.*, 1996; 333: 356.
45. Liao J. K. Endothelium and acute coronary syndromes // *Clinical Chemistry*, 1998; 44: 1799–1808.
46. Loomans C.J., Wan H., de Crom R. et al. Deanfield et al. Endothelial Function and Dysfunction Angiogenic murine endothelial progenitor cells are derived from a myeloid bone marrow fraction and can be identified by endothelial NO synthase expression // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 1760–1767.
47. Ludmer P., Selwyn A., Shook T. et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries // *New Engl. J. Med.*, 1986; 315: 1046–1051.
48. Luscher T.F., Noll G., Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction in hypertension // *J. Hypertens.* — 1996. — Vol. 14[5]. — P. 383–393.
49. Luscher T.F., Yang Z., Tschudi M.R. et al. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins // *Circ. Res.*, 1990; 66: 1088–1094.
50. Mallat Z., Benamer H., Hugel B. et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes // *Circulation*, 2000; 101: 841–843.
51. Mannucci P.M. Von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998; 18: 1359–1362.
52. Mitchell G.F., Vita J.A., Larson M.G. et al. Cross-sectional relations of peripheral microvascular function, cardiovascular disease risk factors, and aortic stiffness: the Framingham Heart Study // *Circulation*, 2005; 112: 3722–3728.
53. Mombouli J.V., Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy // *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1999; 31[1]: 61–74.
54. Op den Buijs J., Musters M., Verrips T. et al. Mathematical modeling of vascular endothelial layer maintenance: the role of endothelial cell division, progenitor cell homing and telomere shortening // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2004; 287: H2651–H2658.
55. Rassaf T., Feelisch M., Kelm M. Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues // *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36: 413–422.
56. Rhee S.G. Cell signaling: H₂O₂, a necessary evil for cell signaling // *Science*, 2006; 312: 1882–1883.
57. Ridker P.M., Brown N.J., Vaughan D.E. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events // *Circulation*, 2004; 109: IV6 –IV19.
58. Ridker P.M., Brown N.J., Vaughan D.E. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events // *Circulation*, 2004; 109: IV6 –IV19.
59. Ridker P.M., Hennekens C.H., Roitman-Johnson B. et al. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men // *Lancet*, 1998; 10: 351: 88–92.
60. Rifai N., Ridker P.M. Inflammatory markers and coronary heart disease // *Curr. Opin. Lipidol.*, 2002; 13: 383–389.
61. Rifai N., Ridker P.M. Inflammatory markers and coronary heart disease // *Curr. Opin. Lipidol.*, 2002; 13: 383–389.
62. Ruggeri Z., Ware J. Von Willebrand factor // *FASEB J.*, 1993; 7: 308–321.
63. Smith S.C. Jr., Anderson J.L., Cannon R.O. 3rd et al. CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: report from the clinical practice discussion group // *Circulation*, 2004; 110: e550–e553.
64. Stefanec T. Endothelial apoptosis. Could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? // *Chest*, 2000; 117: 841–854.
65. Taddei S., Virdis A., Ghiadoni L. Role of endothelin in the control of peripheral vascular tone in human hypertension // *Heart Fail. Rev.*, 2001; 6: 277–285.
66. Vallance P., Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004; 24: 1023–1030.
67. Vasa M., Fichtlscherer S., Adler K. et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease // *Circulation*, 2001; 103: 2885–2890.
68. Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A. et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease // *Circ. Res.*, 2001; 89: E1–E7.
69. Vaughan D.E. PAI-1 and atherothrombosis // *J. Thromb. Haemost.*, 2005; 3: 1879 –1883.
70. Venugopal S.K., Devaraj S., Jialal I. C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells // *Circulation*, 2003; 108: 1676–1678.
71. Verma S., Wang C.H., Li S.H. et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis // *Circulation*, 2002; 106: 913–919.
72. Wagner D.D., Bonfanti R. Von Willebrand factor and the endothelium // *Mayo. Clin. Proc.*, 1991; 66: 621–628.
73. Wei-Chuan Tsai, Yi-Heng Li, Yao-Yi Huang et al. Plasma vascular endothelial growth factor as a marker for early vascular damage in hypertension // *Clinical Science*, 2005; 109: 39–43.
74. Werner N., Wassmann S., Ahlers P., Kosiol S., Nickenig G. Circulating CD31/annexin V apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26: 112–116.
75. Werner N., Nickenig G. Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis // *J. Cell. Mol. Med.*, 2006; 10: 318–332.
76. Woywodt A., Bahlmann F.H., De Groot K. et al. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer // *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2002; 17: 1728–1730.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К КАРДИОЛИПИНУ, β_2 -ГЛИКОПРОТЕИНУ I И ПРОТРОМБИНУ ПРИ АНТИФОСФОЛИПИДНОМ СИНДРОМЕ

Е.Н. АЛЕКСАНДРОВА, А.А. НОВИКОВ, Т.М. РЕШЕТНЯК, Т.В. ПОПКОВА,
М.В. ЧЕРКАСОВА, М.А. ДИАТРОПТОВА, Э.С. МАЧ, Л.Н. ДЕНИСОВ, Е.Л. НАСОНОВ

ГУ институт ревматологии РАМН, Москва

Резюме. Представлен комплекс наиболее информативных методов иммуноферментного анализа (ИФА) антител к фосфолипидам для диагностики и оценки прогноза антифосфолипидного синдрома (АФС). Концентрацию IgG/IgM антител к кардиолипину (аКЛ), β_2 -гликопротеину I ($\alpha\beta_2$ -ГП I) и протромбину (аПТ) в сыворотке крови определяли с помощью ИФА у 408 больных, в т.ч. 82 — с первичным антифосфолипидным синдромом (ПАФС), 99 — с вторичным АФС (ВАФС) на фоне системной красной волчанки (СКВ), 227 — с СКВ без АФС, и 286 здоровых доноров. Обнаружение в сыворотках больных аКЛ и/или $\alpha\beta_2$ -ГП I классов IgG и IgM в концентрации, превышающей $M+5SD$ у доноров (IgG аКЛ $\geq 25,0$ GPL, IgM аКЛ $\geq 24,7$ MPL, IgG $\alpha\beta_2$ -ГП I $\geq 15,3$ ЕД/мл и IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I $\geq 17,0$ ЕД/мл), рекомендуется использовать в качестве лабораторных критериев диагностики АФС. Для диагностики тромбозов наиболее полезными лабораторными тестами являются ИФА IgG аКЛ и ИФА IgG $\alpha\beta_2$ -ГП I, акушерской патологии — ИФА IgG аКЛ. Наиболее полезными прогностическими маркерами тромбозов служат положительные результаты ИФА IgG $\alpha\beta_2$ -ГП I, повторного невынашивания беременности — ИФА IgG аКЛ. ИФА IgG/IgM аПТ является неэффективным тестом для диагностики и прогнозирования АФС.

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром, антитела к кардиолипину, антитела к β_2 -гликопротеину I, антитела к протромбину, иммуноферментный анализ, операционные характеристики теста, ROC-кривая.

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF ANTIBODIES TO CARDIOLIPIN, β_2 -GLYCOPROTEIN I AND PROTHROMBIN IN ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

E.N. ALEXANDROVA, A.A. NOVIKOV, T.M. RESHETNYAK, T.V. POPKOVA,
M.V. CHERKASOVA, M.A. DIATROPTOVA, E.S. MACH, L.N. DENISOV, E.L. NASONOV

State Institution Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Summary. Complex of the most informative methods of immunoenzyme analysis of the antibodies to phospholipids for diagnosis and prognosis evaluation in antiphospholipid syndrome (APS). Concentration of IgG/IgM to cardiolipin, β_2 -glycoprotein I and prothrombin in serum was evaluated by immunoenzyme analysis in 408 patients, 82 of them having primary APS, 99 — secondary APS in SLE, 227 — SLE without APS and 286 healthy donors. Detection of antibodies to β_2 -glycoprotein I (classes IgG and IgM) in concentration more than $M+5SD$ of donors (IgG antibodies to cardiolipin ≥ 25.0 GPL, IgM antibodies to cardiolipin ≥ 24.7 MPL, IgG antibodies to glycoprotein I ≥ 15.3 units/ml and IgM antibodies to glycoprotein I ≥ 7.0 units/ml) is recommended to use a laboratory criteria of APS diagnosis. For thromboses diagnosis the most useful are the results of immunoenzyme analysis for IgG antibodies to cardiolipin and IgG antibodies to glycoprotein I, for obstetric problems — IgG antibodies to cardiolipin. The most useful prognostic markers of thromboses are positive results of IgG to glycoprotein I, for repeated spontaneous abortions — IgG antibodies to cardiolipin and IgG/IgM; antibodies to prothrombin was shown to be ineffective test for diagnosis and prognosis of APS.

Key words: antiphospholipid syndrome, antibodies to cardiolipin, antibodies to glycoprotein I, antibodies to prothrombin, immunoenzyme analysis, operation characteristic of test, ROC-curve.

Антифосфолипидный синдром (АФС) — клинко-лабораторный симптомокомплекс, характеризующийся рецидивирующими венозными и артериальными тромбозами, акушерской патологией, тромбоцитопенией и гиперпродукцией антифосфолипидных антител (аФЛ) [1, 6, 7, 8, 36, 55]; аФЛ — гетерогенная группа аутоантител, распознающих антигенные детерминанты анионных и нейтральных фосфолипидов (ФЛ) и комплексные эпитопы, образующиеся в процессе взаимодействия ФЛ и фосфолипидсвязывающих белков плазмы крови [53]. В последние годы на основе анализа проспективных и

ретроспективных исследований больших групп больных получены убедительные доказательства, свидетельствующие о тесной связи между обнаружением аФЛ и клиническими проявлениями АФС [20, 28, 41, 46]. Важное клиническое значение аФЛ определяется тем, что положительные результаты определения данных аутоантител входят в число лабораторных критериев диагностики АФС и ассоциируются с высоким риском развития тромботических осложнений и акушерской патологии [8, 11, 15, 32, 37, 47, 52, 64]. Согласно международным критериям АФС 1999 года (г. Саппоро, Япония) [64]

лабораторными критериями диагностики АФС служат определение IgG/IgM антител к кардиолипину (аКЛ) в сыворотке в средних или высоких титрах в двух и более исследованиях с интервалом не менее 6 недель стандартным методом иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющим выявлять а β_2 -ГП I — зависимые аКЛ [26, 30, 31, 32, 42, 45, 50], и/или обнаружение волчаночного антикоагулянта (ВА) в плазме в двух или более исследованиях с интервалом не менее 6 недель в фосфолипид-зависимых коагуляционных тестах с использованием рекомендаций международного общества по тромбозам и гемостазу [5, 16]. Вместе с тем определение ВА и аКЛ не позволяет выявить весь спектр аФЛ, ассоциирующихся с различными клиническими проявлениями АФС. Международные критерии АФС 2006 года (г. Сидней, Австралия) [47] наряду с IgG/IgM аКЛ и ВА включают в число лабораторных критериев диагностики заболевания IgG/IgM антитела к β_2 — гликопротеину I (а β_2 -ГП I), определяемые с помощью стандартного ИФА [18, 43, 54]. IgG/IgM аКЛ должны выявляться в средних и высоких титрах, превышающих 40 GPL/MPL или 99 перцентилей, IgG/IgM а β_2 -ГП I — в концентрации более 99 перцентилей. При этом указывается на необходимость обнаружения IgG/IgM аКЛ, ВА и IgG/IgM а β_2 -ГП I в сыворотке или плазме крови в двух и более исследованиях на протяжении не менее 12 недель. Подчеркивается, что диагноз АФС не может быть поставлен, если промежуток между выявлением аФЛ и клинических признаков заболевания составляет менее 12 недель и более 5 лет. Наличие у больных АФС нескольких субтипов аФЛ сопровождается значительным усилением риска развития тромботических осложнений [23, 39, 49]. Несмотря на частое совпадение положительных результатов измерения ВА, аКЛ и а β_2 -ГП I, не существует прямой зависимости между выявлением этих аФЛ в крови больных АФС [44, 60]. Поэтому при низкочувствительных и отрицательных тестах на ВА и аКЛ возникает необходимость определения а β_2 -ГП I. Все это вместе взятое послужило основанием для выделения четырех категорий больных АФС в зависимости от профиля аФЛ с наличием: I — более одного лабораторного критерия (в любой комбинации); IIa — только ВА; IIb — только аКЛ; III — только а β_2 -ГП I [47]. По мнению большинства экспертов, аКЛ и а β_2 -ГП I класса IgA, а также антитела к другим ФЛ и кофакторным белкам (фосфатидилсерину — ФС, фосфатидилинозитолу, фосфатидилэтаноламину, фосфатидилхолину, смеси ФЛ, протромбину — ПТ, комплексу ФС/ПТ, белкам C, S, Z и аннексину V) не имеют доказанного значения для диагностики АФС и поэтому не могут быть включены в лабораторные критерии заболевания. Однако в ряде случаев обнаружение этих аФЛ ассоциируется с «пре-АФС» (или «вероятным» АФС), который характеризуется наличием у больных сетчатого ливеда, хореи, тромбоцитопении, потеря плода, поражения клапанов сердца и может предшествовать развитию тромботических осложнений [13, 59].

К одной из наиболее сложных проблем лабораторной диагностики АФС относится недостаточно высокая специфичность аКЛ. Показано, что, а β_2 -ГП I обладают большей специфичностью, но меньшей чувствительностью в отношении диагностики АФС по сравнению с аКЛ [4, 52]. Однако в целом результаты изучения клинической информативности ИФА аФЛ носят противоречивый характер и зависят от выбранного уровня позитивности, подбора групп больных АФС и методических особенностей анализа аФЛ.

Цель исследования: Изучить связь между уровнем аФЛ в сыворотке крови и основными клиническими признаками АФС; оценить диагностическую точность и прогностическое значение ИФА аКЛ, а β_2 -ГП I и аПТ при АФС.

Материалы и методы

Обследовано 408 больных, в том числе 82 — с первичным АФС (ПАФС) (27 мужчин и 55 женщин; средний возраст — $36,8 \pm 11,3$ лет), 99 — с вторичным АФС (ВАФС), ассоциированным с системной красной волчанкой (СКВ) (29 мужчин и 70 женщин; средний возраст $37,9 \pm 11,7$ лет) и 227 — с СКВ без АФС (67 мужчин и 160 женщин; средний возраст $33,2 \pm 11,1$ лет), наблюдавшихся в ГУ Института ревматологии РАМН в период с 1993 по 2007 год. Диагноз АФС основывался на международных диагностических критериях W.A. Wilson и соавт. [64], СКВ — на критериях Американской Коллегии Ревматологов [34, 57]. ПАФС верифицировался у больных АФС при отсутствии признаков других заболеваний. Контрольная группа состояла из 286 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с обследованными больными. Количественное определение IgG/IgM аКЛ в сыворотке крови проводилось стандартным методом ИФА [2]. Средний уровень ($M \pm SD$) IgG/IgM аКЛ в сыворотках здоровых доноров составил $4,5 \pm 4,1$ GPL ($n = 178$) и $7,2 \pm 3,5$ MPL ($n = 87$) соответственно. Для увеличения достоверности результатов определения аКЛ в качестве верхней границы нормы была принята концентрация аКЛ, превышающая средние значения данного показателя у доноров на 5 SD ($M + 5SD$), т. е. 25,0 GPL и 24,7 MPL. Сыворотки с более высокой концентрацией IgG/IgM аКЛ рассматривали как позитивные. Выделены высоко ($\geq 65,0$ GPL и $\geq 45,0$ MPL), умеренно (35,0–65,0 GPL и 35,0–45,0 MPL), низко (25,0–35,0 GPL и 24,7–35,0 MPL) позитивные и негативные ($< 25,0$ GPL и $< 24,7$ MPL) уровни аКЛ. Концентрацию IgG/IgM а β_2 -ГП I в сыворотке крови определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора реагентов Anti-beta-2-Glycoprotein I IgG/IgM («ORGENTEC Diagnostika», Германия). Верхняя граница нормы для IgG а β_2 -ГП I и IgM а β_2 -ГП I ($M + 5SD$), полученная при исследовании 74 сывороток здоровых доноров, составляла 15,3 и 17,0 ЕД/мл соответственно. Установлены высоко ($\geq 60,0$ ЕД/мл), умеренно (30,0–60,0 ЕД/мл), низко (15,3–30,0 и 17,0–30,0 ЕД/мл)

позитивные и негативные ($<15,3$ и $<17,0$ ЕД/мл) уровни IgG а β_2 -ГП I и IgM а β_2 -ГП I соответственно. Определение аПТ классов IgG и IgM в сыворотке крови проводилось методом ИФА с использованием коммерческого набора реагентов Anti-Protrombin IgG/IgM («ORGENTEC Diagnostika», Германия). Верхняя граница нормы (M+5SD) при исследовании 33 сывороток здоровых доноров составляла 10,1 ЕД/мл для IgG аПТ и 9,8 ЕД/мл для IgM аПТ, что совпадает с рекомендациями фирмы-изготовителя (10,0 ЕД/мл). Оценка диагностической точности ИФА аФЛ осуществлялась путем расчета операционных характеристик теста: диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС), предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов (ПЦПР и ПЦОР), отношения правдоподобия положительного и отрицательного результатов (ОППР и ОПОР) [9]. Наиболее полезными для диагностики АФС являлись лабораторные тесты с ОППР >5 и ОПОР $<0,2$; полезными — с ОППР >2 и ≤ 5 , ОПОР $>0,2$ и $\leq 0,5$; не имеющими пользы — с ОППР ≤ 2 и ОПОР $>0,5$. Для анализа диагностической эффективности лабораторных тестов использовалась также характеристическая кривая (ROC-кривая), отражающая зависимость частоты истинно положительных результатов (чувствительность) от частоты ложноположительных результатов (1-специфичность). Клиническая информативность лабораторного теста определялась тем, насколько высоко лежит его ROC-кривая. Для оценки ROC-кривых вычислялась площадь под кривой (АУС), варьирующая от 0,5 (отсутствие диагностической эффективности теста) до 1,0 (максимальная эффективность теста). Отношение шансов (ОШ) и 95% доверительный интервал для него (ОШ, ДИ 95%) оце-

нивались по методу Woolf [9]. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «Statistica 6,0» («StatSoft», США), включая общепринятые методы параметрического и непараметрического анализа. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты определения концентрации аФЛ в сыворотках больных ПАФС, ВАФС и СКВ и доноров представлены в таблице 1.

Сывороточный уровень IgG аКЛ у больных ПАФС, ВАФС и СКВ был достоверно выше данного показателя у доноров ($p < 0,001$). При ПАФС и ВАФС выявлена более высокая концентрация IgG аКЛ, чем при СКВ ($p < 0,001$). Статистически значимых различий по уровню IgG аКЛ между группами больных ПАФС и ВАФС не обнаружено ($p > 0,05$). Увеличение сывороточной концентрации IgG аКЛ отмечалось у 72% больных ПАФС, 68% больных ВАФС и 24% больных СКВ, причем высокопозитивные результаты определения IgG аКЛ имели 46% больных ПАФС, 36% больных ВАФС и 5% больных СКВ. При ВАФС уровень и частота обнаружения IgG аКЛ у 27 больных с артериальными тромбозами были выше, чем у 40 больных с венозными тромбозами — 47,9 (33,5–107,3) GPL и 26,7 (14,4–57,3) GPL ($p < 0,03$); 78 и 50% ($p < 0,05$) соответственно. При ПАФС уровень IgG аКЛ в сыворотках 29 больных с поражением клапанов сердца (72,9; 35,0–143,0 GPL) в 2 раза превышал соответствующий показатель у 38 больных без патологических изменений клапанов сердца (35,9; 16,7–88,0 GPL; $p < 0,02$). Наряду с этим при ПАФС уровень IgG аКЛ отрицательно коррелировал с коли-

Таблица 1

Концентрация аФЛ в сыворотках больных ПАФС, ВАФС, СКВ и доноров, Ме (ИР)

аФЛ	Группы обследованных			
	ПАФС	ВАФС	СКВ	Доноры
аКЛ				
IgG (GPL)	56,3 (23,0–123,6)* n = 82	38,0 (17,5–81,7)* n = 99	11,3 (5,2–23,8)* n = 224	3,2 (1,5–6,4) n = 178
IgM (MPL)	11,2 (6,0–40,2)* n = 80	14,4 (4,2–38,0)* n = 97	6,5 (3,3–12,4) n = 221	7,1 (4,6–9,6) n = 87
а β_2 -ГП I				
IgG (ЕД/мл)	15,5 (4,2–62,3)* n = 66	13,4 (5,5–46,9)* n = 73	3,0 (1,5–5,7) n = 96	5,5 (3,9–6,6) n = 74
IgM (ЕД/мл)	2,3 (1,2–8,3) n = 51	2,6 (0,9–5,7) n = 35	1,5 (1,1–3,9) n = 31	2,4 (1,5–4,1) n = 74
аПТ				
IgG (ЕД/мл)	3,1 (0,1–7,7) n = 33	4,5 (2,7–8,3)* n = 38	4,0 (2,7–7,3)* n = 18	2,2 (0,2–3,1) n = 33
IgM (ЕД/мл)	0,1 (0,1–2,5) n = 33	2,6 (0,2–5,4)* n = 38	1,9 (0,9–4,3)* n = 18	0,6 (0,1–1,8) n = 33

Примечание: * — $p < 0,05$ относительно доноров.

чеством тромбоцитов в крови ($n=65$; $r=-0,3$; $p<0,02$). У больных СКВ отмечена положительная корреляция между значениями IgG аКЛ, SLEDAI ($n=202$; $r=0,2$; $p<0,01$), ECLAM ($n=170$; $r=0,2$; $p<0,03$) и антител к нативной ДНК (анДНК) ($n=181$; $r=0,3$; $p<0,001$). Сывороточный уровень IgM аКЛ у больных ПАФС и ВАФС достоверно превышал данный показатель у доноров и больных СКВ ($p<0,001$). Статистически значимых различий по уровню IgM аКЛ между группами больных ПАФС и ВАФС не обнаружено ($p>0,05$). При СКВ медиана концентрации IgM аКЛ была в пределах нормы. Увеличение сывороточной концентрации IgM аКЛ отмечено у 34% больных ПАФС, 39% больных ВАФС и 12% больных СКВ. Высоко и умеренно позитивные результаты определения IgM аКЛ имели 28% больных ПАФС, 32% больных ВАФС и 4% больных СКВ. У больных АФС обнаружена положительная корреляция между сывороточными уровнями IgM аКЛ и IgG аКЛ ($n=177$; $r=0,4$; $p<0,001$). Увеличение концентрации аКЛ обоих классов выявлено у 29% больных ПАФС, 31% больных ВАФС и 4% больных СКВ. Изолированное повышение уровня IgG аКЛ отмечалось у 44% больных ПАФС, 34% больных ВАФС и 18% больных СКВ. Изолированное увеличение концентрации IgM аКЛ встречалось значительно реже — у 5% больных ПАФС, 8% больных ВАФС и 8% больных СКВ. В группе больных АФС с изолированным повышением уровня IgM аКЛ ($n=12$) артериальные тромбозы (8%) и поражение клапанов сердца (25%) наблюдались с меньшей частотой по сравнению с больными, позитивными одновременно по IgG/IgM аКЛ ($n=53$) (30 и 55% соответственно; $p<0,05$), а кожные язвы ног — чаще, чем у больных с изолированным обнаружением IgG аКЛ ($n=68$) (58 и 28%; $p<0,02$). При АФС концентрация IgM аКЛ отрицательно коррелировала с количеством тромбоцитов в крови ($n=150$; $r=-0,3$; $p<0,001$). У больных СКВ увеличение сывороточной концентрации IgM аКЛ было связано с повышением SLEDAI ($n=199$; $r=0,2$; $p<0,05$) и ECLAM ($n=172$; $r=0,2$; $p<0,05$).

Сывороточный уровень IgG аβ₂-ГП I у больных ПАФС и ВАФС был выше, чем у доноров и больных СКВ ($p<0,001$). Статистически значимых различий по уровню IgG аβ₂-ГП I между группами больных ПАФС и ВАФС не обнаружено ($p>0,05$). У больных СКВ медиана концентрации IgG аβ₂-ГП I не превышала таковую у доноров. Увеличение концентрации IgG аβ₂-ГП I отмечалось у 50% больных ПАФС, 47% больных ВАФС и 9% больных СКВ, при этом высокопозитивные результаты определения IgG₂-ГП I имели 26% больных ПАФС, 21% больных ВАФС и 1% больных СКВ. Уровень IgG аβ₂-ГП I в сыворотках 5 больных ПАФС с тромбоцитопенией (194,4; 42,2–230,8 ЕД/мл) был выше, чем у 51 больного ПАФС без тромбоцитопении (9,6; 4,1–44,9 ЕД/мл; $p<0,01$). При АФС обнаружена положительная корреляция между уровнями IgG аβ₂-ГП I и IgG аКЛ ($n=139$; $r=0,6$; $p<0,001$) в крови. Одновременное уве-

личение концентрации IgG аβ₂-ГП I и IgG аКЛ обнаружено у 44% больных ПАФС, 40% больных ВАФС и 7% больных СКВ. Изолированное повышение уровня IgG аКЛ отмечалось у 29% больных ПАФС, 26% больных ВАФС и 12% больных СКВ. Изолированное увеличение концентрации IgG аβ₂-ГП I встречалось значительно реже, чем IgG аКЛ, — у 6% больных ПАФС, 5% больных ВАФС и 2% больных СКВ. При АФС в группе больных с сочетанной гиперпродукцией IgG аКЛ и IgG аβ₂-ГП I ($n=58$) эти антитела выявлялись преимущественно в высоких титрах (с частотой 74 и 56% соответственно), а в группах больных с изолированным увеличением IgG аКЛ ($n=38$) и IgG аβ₂-ГП I ($n=8$) — в низких и умеренных титрах (с частотой 66 и 100% соответственно). В то же время достоверных различий по спектру клинических проявлений в сравниваемых группах больных АФС не обнаружено. При СКВ уровень IgG аβ₂-ГП I положительно коррелировал с концентрацией анДНК ($n=72$; $r=0,4$; $p<0,001$) в крови. Достоверных различий по уровню IgM аβ₂-ГП I у больных ПАФС, ВАФС и СКВ и здоровых доноров не выявлено ($p>0,05$). Увеличение сывороточной концентрации IgM аβ₂-ГП I отмечалось у 16% больных ПАФС, 6% больных ВАФС и 3% больных СКВ, при этом высокопозитивные результаты определения IgM аβ₂-ГП I имели 4% больных ПАФС и 3% больных ВАФС. При ПАФС уровень IgM аβ₂-ГП I в сыворотках 17 больных с повторным невынашиванием беременности (ПНБ) был выше, чем у 15 больных без признаков акушерской патологии — 8,3 (2,5–23,6) и 1,9 (1,2–5,3) ЕД/мл соответственно ($p<0,05$), причем наиболее высокая концентрация IgM аβ₂-ГП I определялась у 5 больных с ПНБ, но без тромботических осложнений в анамнезе, — 19,2 (4,0–27,2) ЕД/мл. Одновременное увеличение концентрации IgG аβ₂-ГП I и IgM аβ₂-ГП I обнаружено у 12% больных ПАФС. Изолированное повышение уровня IgG аβ₂-ГП I отмечалось у 41% больных ПАФС, 43% больных ВАФС и 7% больных СКВ. Изолированное увеличение концентрации IgM аβ₂-ГП I встречалось значительно реже по сравнению с IgG аβ₂-ГП I — у 4% больных ПАФС, 6% больных ВАФС и 1% больных СКВ. При АФС отмечена положительная корреляционная связь между уровнями IgM аβ₂-ГП I и IgM аКЛ в сыворотке крови ($n=86$; $r=0,4$; $p<0,001$). Сочетанное увеличение концентрации IgM аβ₂-ГП I и IgM аКЛ обнаружено у 10% больных ПАФС, у 6% больных ВАФС и у 3% больных СКВ. Изолированное повышение уровня IgM аКЛ отмечалось у 26% больных ПАФС, у 49% больных ВАФС и у 19% больных СКВ, а IgM аβ₂-ГП I — только у 6% больных ПАФС.

Медиана концентрации IgG/IgM аПТ при ПАФС не отличалась от нормы, а при ВАФС и СКВ была выше, чем у доноров ($p<0,05$). Достоверных различий по уровню IgG аПТ между больными ПАФС, ВАФС и СКВ не выявлено ($p>0,05$), в то же время уровень IgM аПТ у больных ПАФС был ниже, чем у больных ВАФС ($p<0,02$) и СКВ ($p<0,01$). Увеличение сывороточной

концентрации аПТ класса IgG отмечалось у 18% больных ПАФС, 11% больных ВАФС и 17% больных СКВ; класса IgM — у 3% больных ПАФС, 11% больных ВАФС и 11% больных СКВ. При ВАФС уровень IgM аПТ у 14 больных с венозными тромбозами был выше, чем у 12 больных с артериальными тромбозами — 5,0 (2,7–8,1) и 1,5 (0,4–3,7) ЕД/мл ($p < 0,02$). При АФС отмечена положительная корреляционная связь уровня IgM аПТ с концентрацией IgG аПТ ($n = 71$; $r = 0,5$; $p < 0,001$), IgM аКЛ ($n = 38$; $r = 0,4$; $p < 0,01$) и IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I в сыворотке крови ($n = 20$; $r = 0,5$; $p < 0,02$). Позитивными одновременно по IgG аКЛ, IgG $\alpha\beta_2$ -ГП I и IgG аПТ являлись 7% больных ПАФС и 7% больных ВАФС; позитивными по IgG аКЛ и IgG $\alpha\beta_2$ -ГП I, но негативными по IgG аПТ — 38% больных ПАФС и 28% больных ВАФС; позитивными только по IgG аПТ — 7% больных ПАФС, 3% больных ВАФС и 18% больных СКВ. Позитивными одновременно по IgM аКЛ, IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I и IgM аПТ являлись 5% больных ВАФС; позитивными по IgM аКЛ и IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I, но негативными по IgM аПТ — 13% больных ПАФС; позитивными только по IgM аПТ — 4% больных ПАФС, 15% больных ВАФС и 12% больных СКВ. При ВАФС повышение уровня IgG аПТ было связано с увеличением концентрации анДНК в крови ($n = 20$; $r = 0,5$; $p < 0,05$). При СКВ обнаружена положительная корреляция значений IgG аПТ с ЕСЛАМ ($n = 12$; $r = 0,7$; $p < 0,01$) и уровнем анДНК ($n = 10$; $r = 0,7$; $p < 0,02$), но отрицательная корреляция с количеством тромбозов в анамнезе ($n = 18$; $r = -0,5$; $p < 0,03$).

Полученные результаты подтверждают данные многих исследователей о связи между гиперпродукцией аФЛ и развитием АФС [3, 4, 8, 10, 12, 14, 17, 23, 29, 35, 52, 61]. Уровни IgG/IgM аКЛ и IgG $\alpha\beta_2$ -ГП I в сыворотках больных ПАФС и ВАФС существенно не различались между собой и были достоверно выше, чем у больных СКВ без АФС и у доноров, что соответствует данным других авторов [12, 14, 17, 23, 35]. В отличие от результатов, опубликованных D. Detkova и соавт. [23] и M.L. Bertolaccini и соавт. [14], не обнаружено статистически значимых различий по среднему уровню IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I у больных ПАФС, ВАФС, СКВ и доноров. Сходные данные об отсутствии достоверно более высокой концентрации IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I у больных ПАФС по сравнению с больными СКВ без АФС и донорами приводят D.A. Horbach и соавт. [35]. M.L. Bertolaccini и соавт. [14] выявили более высокий уровень IgG аПТ при СКВ с АФС по сравнению с СКВ без АФС, в то же время концентрация IgM аПТ в этих группах больных была примерно одинаковой. По данным D.A. Horbach и соавт. [35], значения IgG аПТ при ПАФС и IgM аПТ — при ПАФС и СКВ с АФС, были выше таковых при СКВ без АФС, однако различий между титрами IgG аПТ у больных СКВ с и без АФС авторами не прослеживалось.

При АФС отмечена достоверная прямая корреляция между сывороточными уровнями различных аФЛ, что совпадает с результатами других авторов [12, 21, 23, 61].

При этом наиболее выраженная корреляционная взаимосвязь имела место между IgG аКЛ и IgG $\alpha\beta_2$ -ГП I. У больных с изолированным увеличением аКЛ или $\alpha\beta_2$ -ГП I уровень соответствующих антител был более низким, чем у больных, в сыворотке которых выявлялись оба типа антител. Сходные данные получены A. Tsutsumi и соавт. [61], O. Amengual и соавт. [12] и E. Cucurull и соавт. [21].

Показано, что повышение уровня IgG аКЛ при ВАФС и сочетанное увеличение концентрации IgG аКЛ и IgM аКЛ при АФС ассоциируется с артериальными тромбозами, в то время как возрастание титров IgM аПТ при ВАФС — с венозными тромбозами. Обнаружение IgG $\alpha\beta_2$ -ГП I и IgG аПТ в сыворотках больных АФС не зависело от локализации тромбозов в сосудистом русле, а уровень IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I при тромбозах был в пределах нормы. Анализ систематических обзоров литературы свидетельствует о связи положительных результатов определения аКЛ с артериальными тромбозами, $\alpha\beta_2$ -ГП I — с венозными тромбозами [27, 28]. При этом отмечено, что увеличение IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I реже сопровождается развитием тромботических осложнений по сравнению с IgG $\alpha\beta_2$ -ГП I. Имеются также данные о более частом развитии венозных тромбозов у больных СКВ с АФС в присутствии IgG/IgM аПТ [35, 51]. Наиболее выраженное повышение уровня IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I обнаружено у больных ПАФС с акушерской патологией. По данным литературы, развитие акушерской патологии при АФС чаще ассоциируется с обнаружением аКЛ и $\alpha\beta_2$ -ГП I класса IgG [21, 48, 61]. Однако в некоторых работах указывается на достоверное увеличение у больных АФС с ПНБ титров аКЛ и $\alpha\beta_2$ -ГП I класса IgM [22, 56].

При анализе уровня аФЛ в зависимости от нетромботических проявлений АФС отмечена тесная связь между повышением уровня IgG/IgM аКЛ и поражением клапанов сердца у больных ПАФС, что соответствует данным, приведенным в литературе [38, 54]. Наряду с этим изолированное увеличение сывороточной концентрации IgM аКЛ наиболее часто имело место у больных АФС с хроническими язвами ног. Сходные результаты о достоверной связи гиперпродукции IgM аКЛ и IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I с хроническими язвами нижних конечностей представлены J.-C. Wasmuth и соавт. [63]. В группе больных ПАФС с тромбоцитопенией наблюдалось повышение уровня IgG $\alpha\beta_2$ -ГП I, при этом титры IgG/IgM аКЛ и IgG $\alpha\beta_2$ -ГП I отрицательно коррелировали с числом тромбоцитов в крови. Установлено, что увеличение титров IgG/IgM аКЛ и IgG/IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I при АФС ассоциируется с гематологическими нарушениями, включая тромбоцитопению и гемолитическую анемию [21, 23]. При этом, по данным ряда авторов, тромбоцитопения и гемолитическая анемия у больных АФС чаще связаны с гиперпродукцией аФЛ класса IgM, в основном IgM аКЛ, IgM $\alpha\beta_2$ -ГП I и IgM антител к фосфатидилсерину [48, 56]. Положительные результаты определения аКЛ, $\alpha\beta_2$ -ГП I и аПТ класса IgG при СКВ с и без АФС

коррелировали с увеличением концентрации анДНК в крови, что может являться следствием перекрестной реактивности аФЛ и аДНК и косвенно отражать иммунологическую активность патологического процесса, связанного с СКВ. Другими авторами также указывается на положительную корреляцию уровня IgG аβ₂-ГП I с титрами анДНК [61] и более высокую концентрацию IgG/IgM аКЛ в сыворотках больных СКВ с АФС при наличии анДНК [56].

Результаты оценки диагностической точности и прогностического значения ИФА аФЛ при АФС в зависимости от значений «cut off» представлены в таблицах 2, 3 и 4, а также на рисунках 1, 2 и 3. В качестве «cut off» были проанализированы различные уровни позитивности аФЛ, включая выбранную нами верхнюю границу нормы (М+5SD), 99-й перцентиль нормы, титры, соответствующие умеренно и высокопозитивным результатам определения аКЛ (40 GPL/MPL), а также

точку разделения между нормой и патологией, наиболее близкую к перегибу ROC-кривой.

Анализ операционных характеристик ИФА аФЛ относительно верхней границы нормы (М+5SD) показал, что полезными маркерами для диагностики АФС (ОППР >2) являются IgG аКЛ, IgM аКЛ, IgG аβ₂-ГП I и IgM аβ₂-ГП I (табл. 2). При этом IgG аКЛ и IgM аКЛ обладают более высокой чувствительностью (p < 0,01 и p < 0,001 по сравнению с IgG аβ₂-ГП I и IgM аβ₂-ГП I соответственно), а IgG аβ₂-ГП I и IgM аβ₂-ГП I — специфичностью (p < 0,01 и p < 0,05 по сравнению с IgG аКЛ и IgM аКЛ соответственно). В отличие от IgG/IgM аКЛ и IgG/IgM аβ₂-ГП I исследование IgG/IgM антитела к протромбину (аПТ) не представляет диагностической ценности при АФС (ОППР < 1,0; ОПОР > 1,0). Уровни позитивности относительно 99-го перцентиль нормы для IgG аКЛ (16,3 GPL), IgM аКЛ (15,3 MPL), IgG аβ₂-ГП I (12,0 ЕД/мл) и IgM аβ₂-ГП I (13,1 ЕД/мл) ока-

Таблица 2

Диагностическая точность иммуноферментного анализа аФЛ относительно АФС

Тип аФЛ	аКЛ		аβ ₂ -ГП I		аПТ	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
Анализ по верхней границе нормы (М+5SD)						
Cut off	25,0 GPL	24,7 MPL	15,3 ЕД/мл	17,0 ЕД/мл	10,0 ЕД/мл	10,0 ЕД/мл
ДЧ (%)	68,0	36,7	47,5	11,6	14,1	7,0
ДС (%)	76,3	87,3	90,6	96,8	83,3	88,9
ПЦПР (%)	69,9	69,9	88,0	90,9	76,9	71,4
ПЦОР (%)	74,6	63,3	72,5	28,3	19,7	19,5
ОППР	2,16	2,89	5,1	3,60	0,84	0,84
ОПОР	0,54	0,73	0,58	0,91	1,03	1,03
Анализ по умеренной и высокой степени позитивности (40,0 GPL и 40,0 MPL)						
Cut off	40,0 GPL	40,0 MPL	—	—	—	—
ДЧ (%)	51,9	24,3				
ДС (%)	87,5	96,4				
ПЦПР (%)	77,0	84,3				
ПЦОР (%)	62,3	61,4				
ОППР	4,15	6,75				
ОПОР	0,65	0,79				
Анализ по 99-му перцентилю						
Cut off	16,3 GPL	15,3 MPL	12,0 ЕД/мл	13,1 ЕД/мл	—	—
ДЧ (%)	80,7	46,3	52,5	12,8		
ДС (%)	62,9	79,2	89,6	93,5		
ПЦПР (%)	63,8	64,1	88,0	84,6		
ПЦОР (%)	80,1	64,8	56,6	27,9		
ОППР	2,17	2,23	5,05	1,97		
ОПОР	0,31	0,68	0,53	0,93		
Анализ по ROC-кривым						
Cut off	24,0 GPL	13,3 MPL	8,1 ЕД/мл	3,2 ЕД/мл	4,1 ЕД/мл	2,2 ЕД/мл
ДЧ (%)	69,1	50,8	61,9	43,0	50,7	42,3
ДС (%)	75,4	77,4	86,5	74,2	55,6	61,1
AUC	0,798	0,660	0,813	0,571	0,453	0,388
ДИ (95%)	0,755–0,842	0,605–0,715	0,758–0,868	0,456–0,685	0,321–0,584	0,261–0,515

Примечание: Здесь и в таблицах 3 и 4 группой сравнения для расчета операционных характеристик тестов являлись больные СКВ.

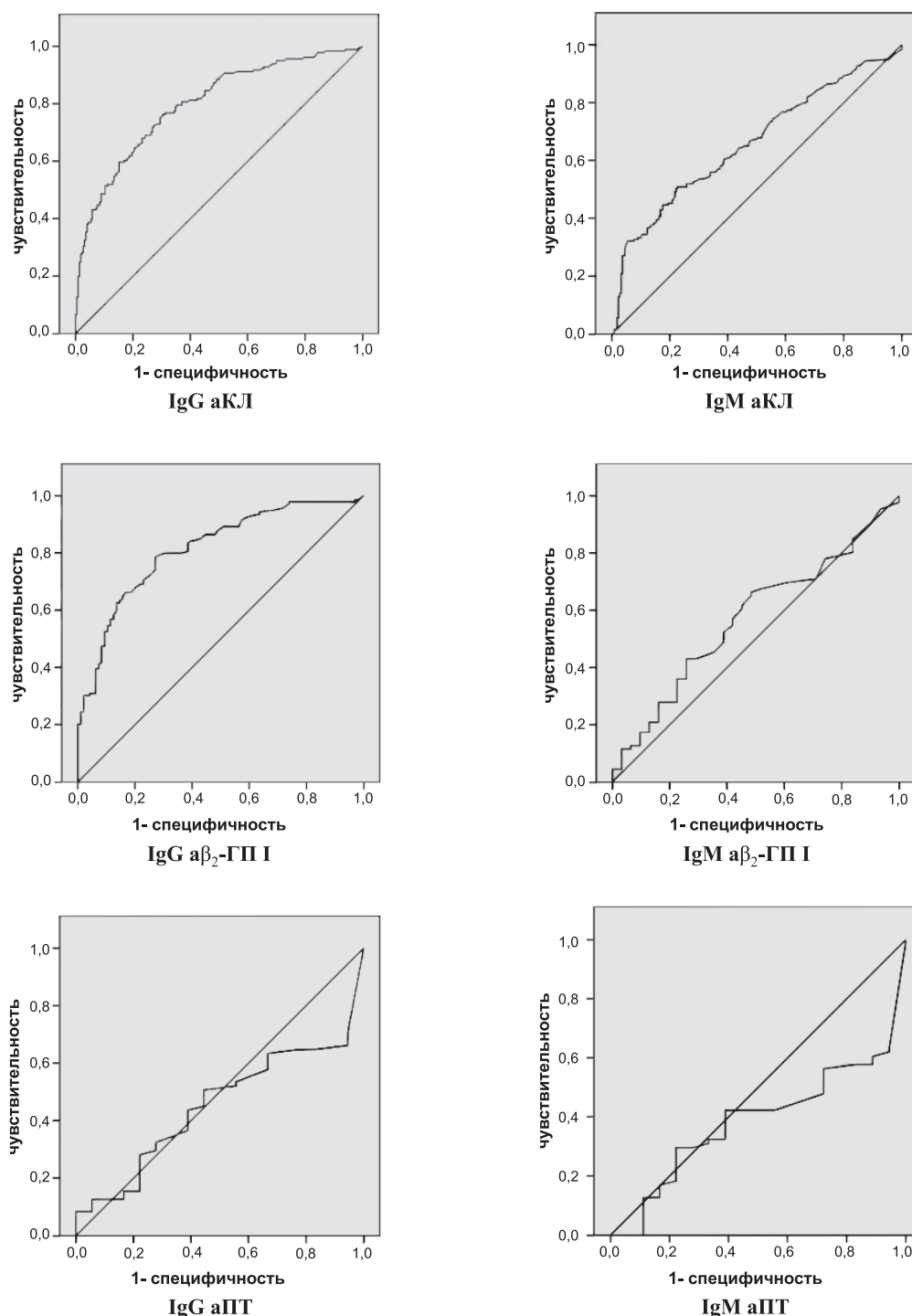


Рис. 1. ROC-кривые ИФА аФЛ для диагностики АФС

зались ниже соответствующих показателей по верхней границе нормы ($M+5SD$), что сопровождалось увеличением ДЧ и уменьшением ДС при сходных значениях ОППР и ОПОР данных тестов. При «cut off» 40 GPL/MPL, наоборот, отмечалось уменьшение ДЧ и увеличение ДС на фоне повышения ОППР до 4,15 для IgG aКЛ и 6,75 для IgM aКЛ. Сравнительная оценка точности ИФА аФЛ по верхней границе нормы ($M+5SD$) и с

помощью ROC-кривых выявила совпадение значений «cut off» (24,0–25,0 GPL), ДЧ и ДС для IgG aКЛ. По данным ROC-анализа, у IgM aКЛ, IgG/IgM aβ₂-ГП I и IgG/IgM aПТ показатели «cut off» и ДС были ниже, а ДЧ — выше, чем соответствующие параметры, рассчитанные относительно верхней границы нормы ($M+5SD$). В целом при всех рассмотренных уровнях позитивности IgG aβ₂-ГП I являлись наиболее специфичными, IgG

аКЛ — наиболее чувствительными, а IgG/IgM аПТ — не имеющими пользы серологическими маркерами АФС. Площадь под ROC-кривой (AUC) при тестировании IgG аКЛ и IgG аβ₂-ГП I была примерно одинаковой, превосходя таковую у IgM аКЛ ($p < 0,001$ в обоих случаях) и IgM аβ₂-ГП I ($p < 0,001$ в обоих случаях), что свидетельствует о наибольшей эффективности ИФА IgG аКЛ и IgG аβ₂-ГП I для диагностики АФС. У IgG/IgM аПТ диагностическая эффективность при АФС отсутствовала (AUC < 0,5) (рис. 1).

При анализе по верхней границы нормы (M+5SD) полезными маркерами для диагностики тромбозов (ОППР > 2 и ≤ 5) являлись IgG аКЛ, IgM аКЛ и IgG аβ₂-ГП I, среди которых более высокой чувствительно-

стью обладали IgG аКЛ ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ по сравнению с IgM аКЛ и IgG аβ₂-ГП I соответственно), а специфичностью — IgM аКЛ и IgG аβ₂-ГП I ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ по сравнению с IgG аКЛ соответственно) (табл. 3). Тестирование IgM аβ₂-ГП I и IgG/IgM аПТ не имело диагностического значения (ОППР < 1 и ОПОР > 1) в отношении тромбозов. При оценке точности ИФА аФЛ для диагностики тромбозов с использованием 99-го перцентиля нормы единственным полезным тестом оказалось определение IgG аβ₂-ГП I (ОППР — 3,24; ОПОР — 0,60), в то время как у IgG/IgM аКЛ уменьшение «cut off» сопровождалось понижением ОППР < 2. При «cut off» 40 GPL/MPL у IgG аКЛ и IgM аКЛ одновременно с уменьшением ДЧ (48,4–22,5%) отмечалось повышение

Таблица 3

Диагностическая точность и прогностическое значение иммуноферментного анализа аФЛ относительно тромбозов

Тип аФЛ	аКЛ		аβ ₂ -ГП I		аПТ	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
Анализ по верхней границе нормы (M+5SD)						
Cut off	25,0 GPL	24,7 MPL	15,3 ЕД/мл	17,0 ЕД/мл	10,0 ЕД/мл	10,0 ЕД/мл
ДЧ (%)	61,3	34,1	44,5	7,5	14,3	7,1
ДС (%)	71,6	85,6	85,7	88,2	84,2	89,5
ПЦПР (%)	64,8	66,7	81,3	63,1	76,9	71,4
ПЦОР (%)	68,4	60,5	52,5	28,3	21,1	20,7
ОППР	2,16	2,37	3,11	0,64	0,91	0,68
ОПОР	0,54	0,77	0,52	1,05	1,01	1,04
ОШ	4,0	3,08	10,55	0,69	0,89	0,65
ДИ (95%)	2,67–6,06	1,88–5,01	5,53–20,33	0,19–2,51	0,22–3,56	0,12–3,64
Анализ по умеренной и высокой степени позитивности (40,0 GPL и 40,0 MPL)						
Cut off	40,0 GPL	40,0 MPL	—	—	—	—
ДЧ (%)	48,4	22,5	—	—	—	—
ДС (%)	85,3	95,3	—	—	—	—
ПЦПР (%)	73,8	80,7	—	—	—	—
ПЦОР (%)	66,0	59,2	—	—	—	—
ОППР	3,32	4,79	—	—	—	—
ОПОР	0,6	0,81	—	—	—	—
ОШ	5,4	5,94	—	—	—	—
ДИ (95%)	3,46–8,51	2,92–12,08	—	—	—	—
Анализ по 99-му перцентилю						
Cut off	16,3 GPL	15,3 MPL	12,0 ЕД/мл	13,1 ЕД/мл	—	—
ДЧ (%)	73,1	41,8	49,6	9,6	—	—
ДС (%)	57,3	76,0	84,7	85,3	—	—
ПЦПР (%)	59,4	59,3	81,9	61,5	—	—
ПЦОР (%)	71,4	60,6	54,6	27,9	—	—
ОППР	1,71	1,74	3,24	0,65	—	—
ОПОР	0,47	0,77	0,60	1,06	—	—
ОШ	3,65	2,25	5,45	0,62	—	—
ДИ (95%)	2,41–5,48	1,46–3,46	2,86–10,50	0,19–2,06	—	—
Анализ по ROC-кривым						
Cut off	18,6 GPL	13,4 MPL	7,2 ЕД/мл	3,2 ЕД/мл	6,4 ЕД/мл	2,2 ЕД/мл
ДЧ (%)	69,9	46,7	62,0	39,8	31,4	41,4
ДС (%)	79,8	80,5	82,6	64,8	68,4	57,9
AUC	0,817	0,634	0,751	0,498	0,406	0,368
ДИ (95%)	0,780–0,854	0,581–0,688	0,695–0,808	0,413–0,583	0,279–0,532	0,245–0,491
ОШ	4,0	2,53	6,78	1,01	0,99	0,97
ДИ (95%)	2,67–6,06	1,68–3,82	3,67–12,45	0,44–2,29	0,33–2,98	0,36–2,46

ДС до 85,3–95,3% и ОППР до 3,32–4,79 относительно тромбозов. По данным ROC-анализа, IgG аКЛ, IgM аКЛ и IgG аβ₂-ГП I имели сходную ДС для диагностики тромбозов, при этом IgG аКЛ проявляли наибольшую ДЧ. AUC у IgG аКЛ и IgG аβ₂-ГП I превышала данный показатель у IgM аКЛ ($p < 0,001$ в обоих случаях), что указывает на более высокую диагностическую информативность определения IgG аКЛ и IgG аβ₂-ГП I относительно тромбозов по сравнению с IgM аКЛ. У IgM аβ₂-ГП I и IgG/IgM аПТ диагностическая эффективность при тромбозах, ассоциирующихся с АФС, отсутствовала ($AUC < 0,5$) (рис. 2). Положительные результаты тестирования IgG/IgM аКЛ и IgG аβ₂-ГП I ассоциировались с увеличением риска развития тромботических осложнений, причем прогностическое значение данных антител относительно тромбозов возрастало вместе с повышением «cut off». Наиболее эффективным тестом для прогнозирования тромбозов являлось определение IgG аβ₂-ГП I относительно верхней границы нормы ($M+5SD$) (ОШ 10,55; 5,53–20,33; ДИ 95%). Риск развития тромбозов при положительных результатах тестирования IgG аβ₂-ГП I был в 2,6 раза выше, чем у IgG аКЛ (ОШ 4,0; 2,67–6,06; ДИ 95%; $p < 0,01$), и в 3,4 выше, чем у IgM аКЛ (24,7 MPL; ОШ 3,08; 1,88–5,10; ДИ 95%; $p < 0,001$). IgM аβ₂-ГП I и IgG/IgM аПТ не являлись факторами риска тромботических осложнений при АФС.

Анализ по верхней границе нормы ($M+5SD$) показал, что полезными маркерами для диагностики ПНБ по уровню ОППР (> 2 и ≤ 5) являются IgM аβ₂-ГП I, по уровню ОПОР ($> 0,2$ и $\leq 0,5$) — IgG аКЛ, причем IgG аКЛ обладают более высокой чувствительностью ($p < 0,001$), а IgM аβ₂-ГП I — специфичностью ($p < 0,001$) (табл. 4). IgG аβ₂-ГП I и IgM аКЛ оказались менее полезными маркерами ПНБ (ОППР ≤ 2 и ОПОР $> 0,5$). IgG/IgM аПТ не имели диагностического значения при ПНБ. Результаты оценки точности ИФА аФЛ для диагностики ПНБ с использованием 99-го перцентиля нормы в целом совпадали с данными, полученными при анализе операционных характеристик по верхней границе нормы ($M+5SD$). При «cut off» 40 GPL/MPL у IgG аКЛ и IgM аКЛ на фоне снижения ДЧ (53,0–23,1%) отмечалось повышение ДС до 77,8–91,0% и ОППР — до 2,39–2,57 относительно ПНБ. Оценка точности ИФА аФЛ для диагностики ПНБ с помощью ROC-кривых выявила одинаковые значения «cut off» (25,0 GPL), ДЧ и более высокий уровень ДС у IgG аКЛ по сравнению с соответствующими параметрами, рассчитанными по верхней границе нормы ($M+5SD$). У IgM аКЛ, IgG/IgM аβ₂-ГП I и IgG/IgM аПТ по данным ROC-анализа показатели «cut off» были ниже, ДЧ — выше, а ДС — ниже (в случае IgM аβ₂-ГП I и IgG/IgM аПТ) или примерно равны (в случае IgM аКЛ и IgG аβ₂-ГП I) при сопоставлении с результатами изучения диагностической точности тестов относительно ПНБ по верхней границе нормы ($M+5SD$). AUC для IgG аКЛ относительно ПНБ превышала данный показатель у IgM аКЛ ($p < 0,001$), IgG

аβ₂-ГП I ($p < 0,001$) и IgM аβ₂-ГП I ($p < 0,001$). У IgG/IgM аПТ диагностическая эффективность в отношении ПНБ практически отсутствовала (AUC около 0,5) (рис. 3). Полученные результаты указывают на более высокую диагностическую информативность определения IgG аКЛ относительно ПНБ при АФС по сравнению с другими субтипами аФЛ. Положительные результаты тестирования IgG/IgM аКЛ и IgG аβ₂-ГП I ассоциировались с увеличением риска развития акушерской патологии. При уровне позитивности, установленном по верхней границе нормы ($M+5SD$), определение IgG аКЛ (ОШ 4,21; 2,34–7,62; ДИ 95%) было более эффективным тестом для прогнозирования ПНБ по сравнению с IgM аКЛ (ОШ 2,14; 1,21–3,78; ДИ 95%; $p < 0,05$) и, в меньшей степени, по сравнению с IgG аβ₂-ГП I (ОШ 2,90; 1,35–6,18; ДИ 95%; $p > 0,05$). IgM аβ₂-ГП I и IgG/IgM аПТ не имели прогностического значения в отношении ПНБ при АФС.

Полученные результаты хорошо согласуются с материалами других авторов о диагностической точности аФЛ и их роли в оценке прогноза АФС [12, 17, 19, 23, 29, 33, 35, 40, 52, 55, 61]. По данным литературы, чувствительность ИФА IgG аКЛ для диагностики АФС составляет 45–68%, IgM аКЛ — 35–69%; специфичность — 71–75 и 72–81% соответственно. Наиболее высокие показатели ДЧ (83%) и ДС (99%) аβ₂-ГП I были получены J. Guerin и соавт. [29]. По данным R. Roubey и соавт. [55], IgG аКЛ и IgG аβ₂-ГП I обладают одинаковой чувствительностью (57,0%) для диагностики АФС, однако в большинстве исследований тестирование IgG аβ₂-ГП I и IgM аβ₂-ГП I имеет бо льшую ДС (83–91 и 87% соответственно) и меньшую ДЧ (23–60 и 23–32% соответственно) при АФС по сравнению с IgG и IgM аКЛ. J. Musial и соавт. [48] показано, что при тромбозах AUC у IgG аКЛ (0,660; 0,580–0,740; ДИ 95%) и IgG аβ₂-ГП I (0,620; 0,530–0,700; ДИ 95%) сопоставима с таковой у IgM аКЛ (0,630; 0,540–0,710; ДИ 95%), а при ПНБ значения AUC у IgG аβ₂-ГП I (0,720; 0,570–0,860; ДИ 95%) и IgG аКЛ (0,700; 0,560–0,850; ДИ 95%) примерно равны и несколько выше, чем у IgM аКЛ (0,650; 0,500–0,800; ДИ 95%). Вместе с тем, по данным литературы, наиболее ценными прогностическими маркерами АФС являются IgG аКЛ и IgG аβ₂-ГП I, при обнаружении которых относительный риск развития тромботических осложнений составляет 2,49–6,42 и 2,4–9,8, акушерской патологии — 5,06–19,0 и 7,0–27,0 соответственно [12, 21, 25, 27, 28, 48, 52, 61].

Результаты изучения диагностической точности и прогностического значения ИФА аКЛ и аβ₂-ГП I зависят от выбранного уровня позитивности. Верхняя граница нормы для IgG аКЛ в сыворотке крови варьирует от 4,0 до 30,0 GPL; IgM аКЛ — от 3,0 до 20,0 MPL; IgG/IgM аβ₂-ГП I — от 4,0 до 20,0 ЕД/мл [14, 24, 33, 52, 58, 63]. Согласно международным критериям диагностики АФС 2006 года [47] верхняя граница нормальной концентрации IgG/IgM аКЛ в сыворотке крови должна составлять

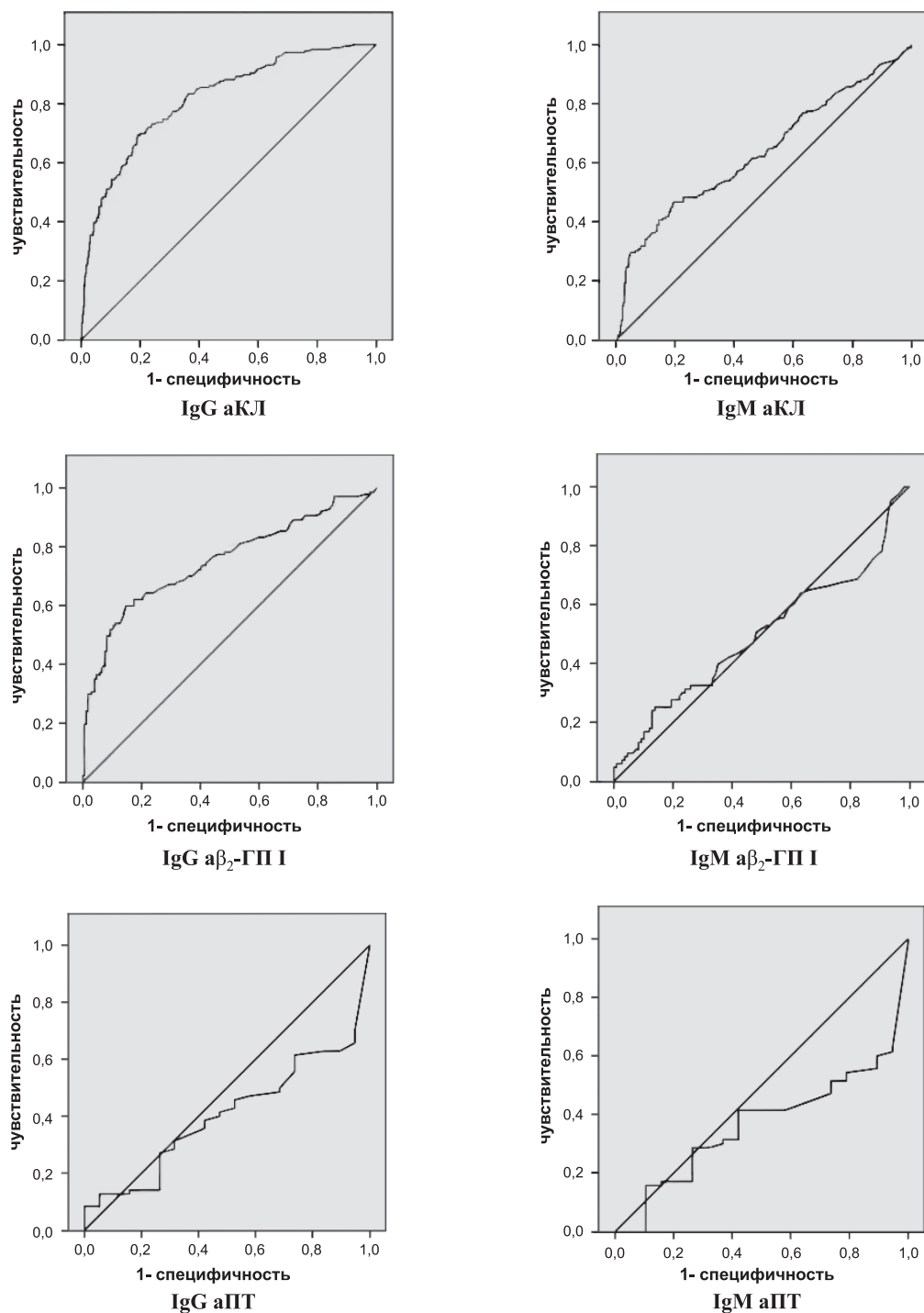


Рис. 2. ROC-кривые ИФА аФЛ относительно тромбозов

40 GPL/MPL, что соответствует умеренно и высоко позитивным результатам определения этих антител, или 99 перцентилей, IgG/IgM аβ₂-ГП I — 99 перцентилей. В нашей работе уровни позитивности относительно 99-го перцентиля нормы для IgG/IgM аКЛ и IgG/IgM аβ₂-ГП I оказались ниже соответствующих показателей по верхней границе нормы (M+5SD), что сопровождалось увеличением ДЧ и уменьшением ДС при снижении

ОППР и ОПОР данных тестов относительно диагностики тромботических осложнений АФС. При «cut off» 40 GPL/MPL, наоборот, отмечалось уменьшение ДЧ и увеличение ДС на фоне повышения ОППР для IgG аКЛ и IgM аКЛ. Сравнительная оценка точности ИФА аФЛ по верхней границе нормы (M+5SD) и с помощью ROC-кривых выявила совпадение значений «cut off» (24,0–25,0 GPL) у IgG аКЛ для диагностики АФС и акушер-

Диагностическая точность и прогностическое значение иммуноферментного анализа аФЛ относительно ПНБ

Тип аФЛ	аКЛ		аβ ₂ -ГП I		аПТ	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
Анализ по верхней границе нормы (M+5SD)						
Cut off	25,0 GPL	24,7 MPL	15,3 ЕД/мл	17,0 ЕД/мл	10,0 ЕД/мл	10,0 ЕД/мл
ДЧ (%)	69,7	35,4	52,3	21,2	13,0	0
ДС (%)	63,9	79,5	72,8	92,5	88,9	88,9
ПЦПР (%)	37,1	34,8	51,1	63,6	37,5	0
ПЦОР (%)	87,3	79,9	73,8	65,2	66,6	63,5
ОППР	1,93	1,73	1,92	2,83	1,17	0
ОПОР	0,47	0,81	0,66	0,85	0,98	1,12
ОШ	4,21	2,14	2,90	3,30	1,2	0
ДИ (95%)	2,34–7,62	1,21–3,78	1,35–6,18	0,85–12,7	0,28–5,21	–
Анализ по умеренной и высокой степени позитивности (40,0 GPL и 40,0 MPL)						
Cut off	40,0 GPL	40,0 MPL	–	–	–	–
ДЧ (%)	53,0	23,1				
ДС (%)	77,8	91,0				
ПЦПР (%)	42,2	44,1				
ПЦОР (%)	84,4	79,3				
ОППР	2,39	2,57				
ОПОР	0,6	0,85				
ОШ	3,94	3,04				
ДИ (95%)	2,23–6,97	1,42–6,50				
Анализ по 99-му процентилю						
Cut off	16,3 GPL	15,3 MPL	12,0 ЕД/мл	13,1 ЕД/мл	–	–
ДЧ (%)	75,8	47,7	54,5	21,2		
ДС (%)	52,3	70,5	69,1	90,6		
ПЦПР (%)	32,7	33,3	49,0	58,3		
ПЦОР (%)	87,6	81,3	73,7	64,9		
ОППР	1,59	1,62	1,79	2,25		
ОПОР	0,46	0,74	0,66	0,87		
ОШ	3,42	2,17	2,67	2,74		
ДИ (95%)	1,90–6,18	1,22–3,82	1,25–5,70	0,8–9,41		
Анализ по ROC-кривым						
Cut off	25,1 GPL	13,3 MPL	8,4 ЕД/мл	3,2 ЕД/мл	4,1 ЕД/мл	2,2 ЕД/мл
ДЧ (%)	69,7	55,4	61,4	54,5	52,2	47,8
ДС (%)	80,3	76,5	75,6	63,3	52,2	56,5
AUC	0,809	0,648	0,678	0,603	0,516	0,476
ДИ (95%)	0,753–0,864	0,565–0,730	0,576–0,779	0,490–0,716	0,370–0,662	0,325–0,627
ОШ	4,21	2,77	2,56	2,0	1,25	1,25
ДИ (95%)	2,34–7,62	1,57–4,86	1,2–5,48	0,83–4,81	0,46–3,39	0,46–3,39

ской патологии. Прогностическое значение положительных результатов тестирования IgG/IgM аКЛ и IgG аβ₂-ГП I относительно тромбозов и акушерской патологии возрастало вместе с повышением «cut off» и было наиболее выраженным при использовании верхней границы нормы M+5SD. Все это вместе взятое свидетельствует о том, что установленные значения «cut off» (M+5SD) у IgG аКЛ (25,0 GPL), IgM аКЛ (24,7 MPL), IgG аβ₂-ГП I (15,3 ЕД/мл) и IgM аβ₂-ГП I (17,0 ЕД/мл) отражают оптимальное соотношение операционных характеристик лабораторных тестов (ДЧ, ДС, ОППР, ОПОР) и ОШ для диагностики АФС и оценки риска развития тромбозов и акушерской патологии.

Заключение

1. Повышение уровня антифосфолипидных антител, обнаруживаемых в сыворотке больных при использовании стандартных методов ИФА, тесно связано с основными клиническими проявлениями АФС. Диагностическими маркерами АФС служат IgG/IgMaКЛ и IgG/IgM аβ₂-ГП I, при этом IgG аКЛ и IgM аКЛ обладают большей чувствительностью, а IgG аβ₂-ГП I и IgM аβ₂-ГП I — большей специфичностью. По данным ROC-анализа, диагностическая точность определения IgG аКЛ и IgG аβ₂-ГП I выше таковой у IgM аКЛ и IgM аβ₂-ГП I. Иммуноферментный анализ IgG/IgM аПТ является неэффективным тестом для диагностики АФС.

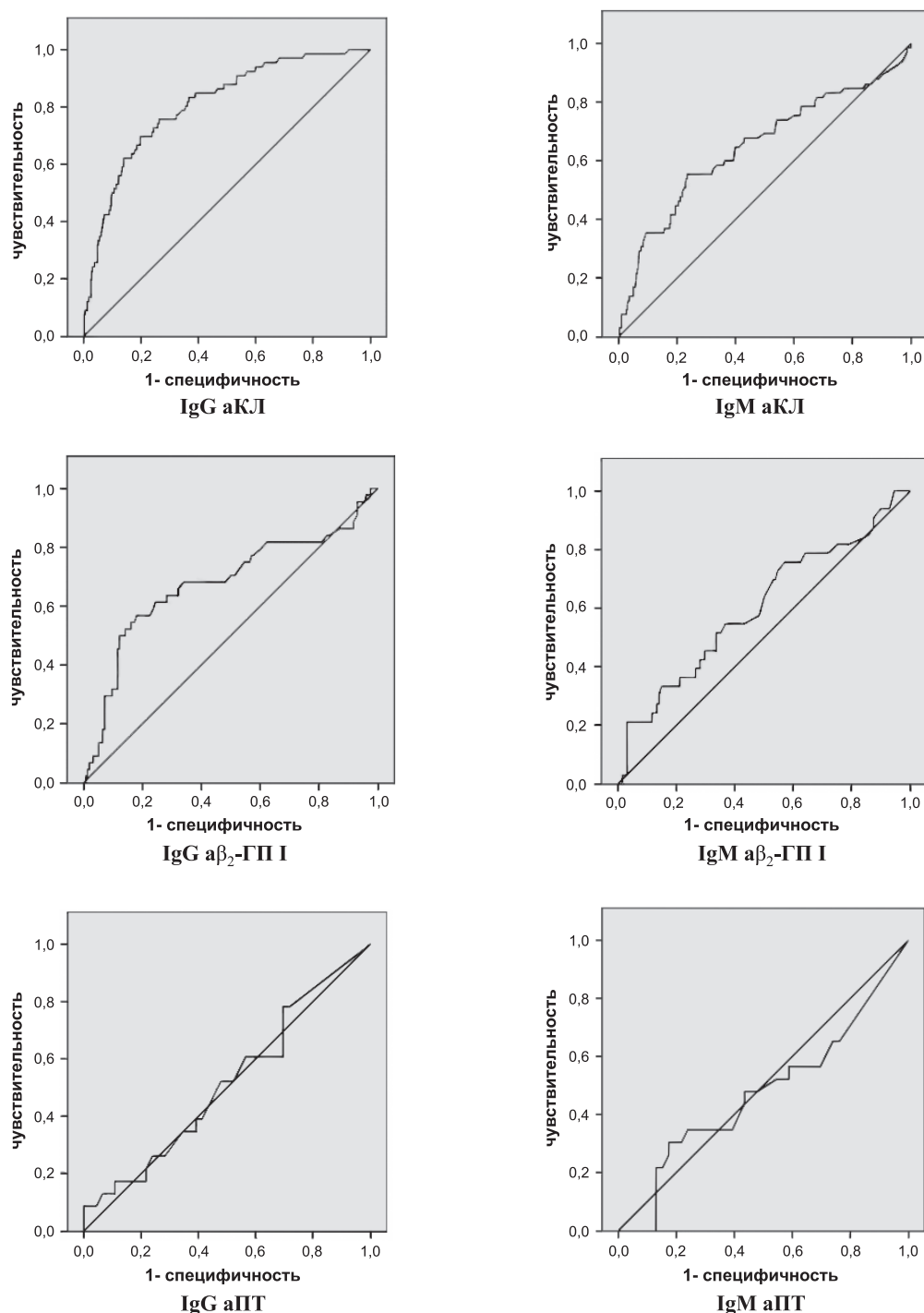


Рис. 3. ROC-кривые ИФА аФЛ относительно ПНБ

2. Относительно тромбозов диагностическая точность определения IgG аКЛ и IgG аβ₂-ГП I превышает таковую у IgM аКЛ. Риск развития тромбозов при обнаружении IgG аβ₂-ГП I выше, чем у IgG аКЛ и IgM аКЛ. Определение IgM аβ₂-ГП I и IgG/IgM aПТ не имеет диагностического и прогностического значения при тромбозах, ассоциирующихся с АФС.

3. Относительно акушерской патологии диагностическая точность определения IgG аКЛ превышает

таковую у IgM аКЛ и IgG/IgM аβ₂-ГП I. Риск повторного невынашивания беременности при обнаружении IgG аКЛ выше, чем у IgM аКЛ ($p < 0,05$), и достоверно не отличается от такового у IgG аβ₂-ГП I ($p > 0,05$). Уровни IgG/IgM aПТ не имеют достоверного значения для диагностики АФС, IgM аβ₂-ГП I и IgG/IgM aПТ — для оценки риска развития акушерской патологии при АФС.

Список литературы находится в редакции.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ, АПОПТОЗА И ЦИТОКИНОВ ПРИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЯХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОГО ГЕНЕЗА

М.В. ИВАНОВ, О.Н. ВОСКРЕСЕНСКАЯ, Н.Б. ЗАХАРОВА

Кафедра неврологии ФПК и ППС ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава
Центральная научно-исследовательская лаборатория СГМУ, Саратов

Резюме. В статье обсуждается проблема когнитивных расстройств (КР) у больных артериальной гипертензией (АГ), их нейропсихологическая характеристика, клинко-диагностическое значение показателей эндотелиальной дисфункции, апоптоза. С целью проведения комплексного анализа когнитивных функций, эмоционального состояния, данных МРТ головного мозга были обследованы 80 пациентов (средний возраст $52,4 \pm 4,2$ года) с АГ без инсульта в анамнезе. Группу контроля составили 15 испытуемых, сходных по полу, возрасту и уровню образования. С помощью Краткой шкалы оценки психического статуса, тестов на вербальную, ассоциативную память и концентрацию внимания были выявлены когнитивные нарушения у 63 пациентов. У них определялись концентрации NO, эндотелина-1 (ЭТ-1), маркеров апоптоза и цитокинов (фактор некроза опухоли (ФНО α) и интерлейкин-4 (ИЛ4)) в крови, которые коррелировали с уровнем когнитивной дисфункции у больных в изучаемых группах. Результаты проведенного исследования показывают, что показатели эндотелиальной дисфункции, апоптоза и локального иммунного воспаления могут учитываться при ранней диагностике КР у больных с АГ.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, когнитивные нарушения, эндотелиальная дисфункция, апоптоз, цитокины.

DIAGNOSTIC ROLE OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION, APOPTOSIS MARKERS AND CYTOKINES IN COGNITIVE IMPAIRED ARTERIAL HYPERTENSION PATIENTS

M.V. IVANOV, O.N. VOSKRESENSKAYA, N.B. ZAKHAROVA

Neurology department of Faculty for postgraduate training of the teaching staff
State educational institution of Higher Professional Education "Saratov State Medical University,
Federal Agency for Health Care and Social Development"
Central Scientific Research Laboratory of Saratov State Medical University

Summary. The article reviews the item concerning cognitive disorders (CD) in patients with arterial hypertension (AH), its neuropsychological characteristics and substrates of endothelial dysfunction and apoptosis. The complex analysis of cognitive functioning, emotional state, MRI data was performed in 85 patients with AH, mean age $54,6 \pm 5,1$ years, without a history of stroke, and 15 controls matched for age, sex and education. The group of 63 patients with CD was specified assessing by Mini Mental State Examination, tests of verbal and associative memory, attention concentration. Blood concentration of NO, endothelin-1 (ET-1), apoptosis markers (FasL, ApoFas) and cytokines (TNF α and IL4) were measured. They appeared to correlate with the level of cognitive dysfunction in researching groups. The results of the study suggest that markers of endothelial dysfunction, apoptosis and immune inflammation could help in diagnostic of cognitive impairments in patients with AH.

Key words: arterial hypertension, cognitive impairments, endothelial dysfunction, apoptosis, cytokines.

Увеличение распространенности нарушений когнитивных функций по мере увеличения доли пожилых лиц в популяции оказывает существенное влияние на состояние общества в целом и служит одной из наиболее актуальных медико-социальных проблем [2, 3, 4, 10]. В многочисленных работах подчеркивается, что артериальная гипертензия (АГ) является основным корригируемым фактором риска развития сосудистых когнитивных расстройств [9, 18, 22].

Сосудистые когнитивные расстройства рассматриваются как преддементная форма при хронической цереброваскулярной недостаточности [1, 2, 4, 18, 20].

В научной литературе недостаточно освещены особенности ранних когнитивных нарушений при АГ, что требует поиска специфических неврологических, нейропсихологических и иммуно-биохимических маркеров [12, 26].

Возможности лабораторной диагностики когнитивных нарушений привлекают внимание исследователей [24].

Представляется целесообразным установить взаимосвязь неврологической симптоматики не только с показателями нейропсихологического тестирования, но и с изменениями активности показателей эндотелиальной

дисфункции (ЭД), апоптоза, играющих важную роль в патогенезе как АГ, так и сосудистых когнитивных расстройств.

Считается, что нарушение синтеза физиологических концентраций оксида азота (NO) играет важнейшую роль в механизмах инициации и прогрессирования эндотелиальной дисфункции [6, 8, 19]. NO обладает антиоксидантным и вазодилатирующим действием, являясь универсальным ключевым ангиопротективным фактором.

Баланс в системе вазорегуляции обеспечивается помимо вазодилататоров активным функционированием констрикторных агентов, к которым относится эндотелин-1 (ЭТ-1). В низких концентрациях ЭТ-1 дает вазодилатирующий эффект, а в высоких опосредует вазоконстрикцию артерий и вен путем активации Ca^{2+} -каналов, участвуя также в процессах программированной клеточной гибели — апоптозе [15].

Апоптоз играет важную роль в реализации механизмов адаптации организма к воздействию внешней среды. Это генетически регулируемый процесс, участвующий в дифференцировке, морфогенезе, а также в поддержании клеточного гомеостаза [15, 17, 20, 23]. Начальный этап запрограммированной клеточной гибели — прием сигнала, предвестника апоптоза в виде информации, поступающей к клетке извне или возникающей в недрах самой клетки [13]. Описаны соответствующий индукторный фактор и его рецептор. Это Fas-лиганд (FasL) и Fas-рецептор (Fas, ApoFas, CD95). Fas-лиганд — это трансмембранный белок, который экспрессируется на зрелых активированных клетках (в основном на Т- и NK-лимфоцитах). FasL, взаимодействуя с соответствующим Fas-рецептором, активируется и запускает программу смерти клетки. При экспрессии FasL на клетках его растворимая форма может попадать в циркуляторное русло, провоцируя клетки, имеющие на своей поверхности Fas-рецептор, к апоптозу [13, 15, 20].

Хроническая ишемизация головного мозга, вызванная АГ, активирует микроглиальные клетки, приводя к индукции местного воспалительного ответа с участием цитокинов [6, 16]. Важными клетками-мишенями для цитокинов являются астроциты, участвующие, в том числе, в снижении иммунологической толерантности организма к тканям головного мозга, что наряду с процессами эндотелиальной дисфункции и апоптоза приводит к повреждению нейрональной ткани [1, 24, 25].

Цель исследования: определение клинико-диагностического значения показателей эндотелиальной дисфункции, маркеров апоптоза и цитокинов при когнитивных нарушениях у больных с АГ.

Материал и методы

В исследование включены 80 пациентов (женщин — 43, мужчин — 37) с АГ I–III степени (по классификации ВОЗ-МОГ, 1999) в возрасте от 48 до 63 лет (в среднем

$52,4 \pm 4,2$ года). Все больные были разделены на группы согласно стадиям АГ. Среди них больных АГ I степени было 19, II степени — 46, III — 15 человек. Достоверных отличий по возрасту и тяжести состояния среди мужчин и женщин внутри каждой обследованной группы выявлено не было.

В исследование не включали лиц, перенесших транзиторные ишемические атаки, мозговой инсульт или инфаркт миокарда, а также больных с тяжелыми соматическими заболеваниями.

Всем больным проводилась МРТ головного мозга. В 75% наблюдений были выявлены признаки церебральной субатрофии и атрофии, начального лейкоареоза, расширения желудочковых пространств [11].

В качестве группы контроля (КГ) обследованы 15 здоровых лиц (средний возраст составил $51 \pm 6,1$ года) без АГ и клинических признаков хронической ишемии мозга.

Оценка когнитивных функций проводилась с использованием краткой шкалы оценки психического статуса — КШОПС (Mini Mental State Examination), пробы Шульте (среднее время выполнения теста), определение слуховой памяти — по методу R. Meili (1969) и ассоциативной памяти — по В.М. Блейхеру (1976). Анализ эмоционального фона осуществлялся с помощью Госпитальной шкалы тревоги и депрессии. Результаты тестирования оценивались в баллах [3, 7].

В сыворотке крови для определения общего количества NO использовали наборы реактивов фирмы «R&D Systems» Total NO/Nitrite/Nitrate Assay. Результаты выражали в мкмоль/л. Содержание факторов апоптоза (ApoFas, FasL), эндотелина-1 (ЭТ-1) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реактивов фирм «Biomedica Gruppe» и «Bender MedSystems» (Австрия). Результаты выражали в пг/мл. Исследование содержания цитокинов (ФНО α и ИЛ4) в сыворотке крови проводили методом твердофазного ИФА, выполненного с использованием тест-системы «Вектор-Бест» (Россия) [9].

Для статистического анализа данных применялась программа Statistica '99 Edition, версия 5.5A. По каждой группе указывались средние арифметические значения и ошибки среднего ($M \pm \delta$), а также коэффициент корреляции r , вычисляемый ранговым методом Спирмена. Все количественные показатели обрабатывались статистически с вычислением степени достоверности по t -критерию Стьюдента для независимых выборок. За достоверные принимались корреляционные связи при значениях $r = 0,3–1,0$ ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Результаты предложенных в нейропсихологическом исследовании тестов представлены в таблице 1.

По результатам теста Mini Mental State Examination было выявлено достоверно более низкое количество

Таблица 1

Показатели нейропсихологического тестирования у больных с АГ и здоровых лиц

Тест / Группы	MMSE	Вербальные ассоциации	Слухо-речевая память	Тест Шульте
1	27,5 ± 1,6	31,4 ± 4,2	9,75 ± 1,1*	45,6 ± 8,8
2	25,3 ± 1,4*	25,8 ± 5,2**	9,63 ± 3,9	54,1 ± 6,2**
3	24,8 ± 1,2*	24,0 ± 2,1*	9,1 ± 1,9*	59,1 ± 10,1*
КГ	28,6 ± 0,3	35,2 ± 3,8	14,5 ± 2,6	45,2 ± 3,5

Примечание. Достоверность различий с группой контроля * — $p < 0,05$, между 1 и 2 группами ** — $p < 0,05$.

баллов у больных с АГ II–III ст. по сравнению со здоровыми лицами. Результаты выполнения задания «Вербальные ассоциации» группой здоровых лиц достоверно лучше, чем у пациентов с АГ II–III ст. Значения результатов теста на слухоречевую память при $p < 0,05$ позволяют выявить снижение данной мнестической модальности у страдающих АГ. Среднее время выполнения пробы Шульте у больных с АГ I ст. и здоровых лиц было достоверно меньше по сравнению с пациентами с АГ II–III ст., что отражает ухудшение способности к кон-

центрации внимания, нарушение всех этапов переработки информации у последних. В группе больных с АГ I ст. достоверные различия по сравнению с КГ наблюдались только по тесту на слухоречевую память.

Особого внимания заслуживает своевременное выявление депрессии с преобладанием апатического или тревожного состояния. Анализ данных Госпитальной шкалы тревоги и депрессии позволил констатировать достоверное нарастание тревожности в группах пациентов с АГ по сравнению с группой контроля. Однако отсутствовали верифицируемые критерии наличия депрессии у лиц в исследуемых группах.

В группу пациентов с КР вошли 63 человека с АГ II–III ст., которым проведены лабораторные обследования.

Результаты изменения вазоактивных показателей и маркеров апоптоза представлены в таблице 2. Анализ значения содержания NO в крови показал его снижение у больных с КР. В то время как количество ЭТ-1 в сыворотке больных АГ с КР достоверно выше, чем у здоровых лиц. Такое соотношение можно объяснить тем, что основная часть NO находится в субэндотелиальном слое сосудистой стенки и в условиях развития АГ его активность ингибируется нарастающим синтезом вазоконстрикторов, что приводит к усугублению возникшей уже эндотелиальной дисфункции [6, 12, 21, 22].

В сыворотке больных из группы с КР выявлено достоверно повышенное содержание маркеров апоптоза,

Таблица 2

Показатели вазоактивных медиаторов, цитокинов и маркеров апоптоза у больных с КР и здоровых лиц

Показатели / Группы	NO	ЭТ-1	ApoFas	FasL	ФНОα	ИЛ4
Больные с КР	4,33 ± 0,93*	1,91 ± 0,96*	488,8 ± 57,9*	0,55 ± 0,17*	4,8 ± 1,8*	25,2 ± 2,4*
КГ	5,92 ± 0,74	0,37 ± 0,08	64,4 ± 17,9	0,01 ± 0,03	1,3 ± 0,4	3,7 ± 1,6

Примечание. Достоверность различий с группой контроля * — $p < 0,05$.

Таблица 3

Корреляционные связи между результатами нейропсихологического тестирования, показателями содержания вазоактивных медиаторов, цитокинов и маркеров апоптоза у здоровых лиц

Показатели у здоровых лиц	Коэффициент корреляции r					
	NO	ЭТ-1	FasL	ApoFas	ФНОα	ИЛ4
MMSE	–0,223	–0,480	0,358	0,615*	0,512*	–0,14
Верб. ассоц.	–0,7*	–0,67*	0,222	0,156	0,28	0,45*
Слух. память	–0,684	0,625	–0,208	–0,771*	–0,34	0,67*
тест Шульте	–0,794*	0,65*	0,175	–0,087*	0,47	0,15

Примечание. Достоверность корреляции * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

Таблица 4

Корреляционные связи между результатами нейропсихологического тестирования, показателями содержания вазоактивных медиаторов, цитокинов и маркеров апоптоза у больных с КР

Показатели у больных с КР	Коэффициент корреляции r					
	NO	ЭТ-1	FasL	ApoFas	ФНОα	ИЛ4
MMSE	–0,434	–0,623	–0,8122*	0,408*	0,78*	–0,57
Верб. ассоц.	0,64*	–0,88*	0,7455*	0,802	0,56	0,22
Слух. память	–0,222	–0,647	–0,7805**	0,456	–0,46	0,14
тест Шульте	–0,026	0,07*	0,4853*	–0,759**	0,65*	–0,53

Примечание. Достоверность корреляции * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

что может говорить как о прогрессировании эндотелиальной дисфункции, так и истощении ресурса ангиопротективных систем [10, 13].

В таблицах 3 и 4 представлены результаты корреляционного анализа с использованием коэффициента r , вычисленного между результатами, полученными при проведении нейропсихологических тестов и исследовании функциональной активности, иммунно-воспалительных изменений эндотелия.

В норме у лиц из КГ достоверные корреляционные связи между NO и ЭТ-1 (вазоактивные медиаторы) выявлены с показателями теста на вербальные ассоциации ($r = -0,7$ и $-0,67$ соответственно), теста Шульте ($r = -0,79$ и $0,65$) и на слухоречевую память ($r = -0,684$ и $0,625$). При наличии КР и АГ эти корреляционные связи меняются. Они выявлены между содержанием названных медиаторов с результатами тестов на вербальную ассоциацию ($r = 0,64$ и $-0,88$ при $p < 0,05$) и между ЭТ-1 и тестом Шульте ($r = 0,07$ при $p < 0,05$), а также между ФНОα и результатами MMSE, пробы Шульте ($r = 0,78$ и $0,65$ при $p < 0,05$). Обращает на себя внимание, что достоверные корреляционные связи существуют также между содержанием Fas-рецептора и результатами тестов Шульте и MMSE. Корреляционные связи между такими показателями, как слухоречевая память и Fas-рецептор, утрачиваются у больных с КР, однако повышается корреляция между FasL и результатами тестов на вербальные ассоциации, слухоречевую память и MMSE.

Выводы

Основой для настоящего исследования послужило предположение о наличии взаимосвязи между появлением признаков ранних когнитивных расстройств у больных с АГ и изменением содержания молекулярных маркеров ЭД и воспаления.

Полученные нами данные подтвердили, что у пациентов с ранней верификацией когнитивных нарушений, а именно у больных с АГ без острых цереброваскулярных эпизодов, в анамнезе имеются взаимосвязи между изме-

нением нейропсихологических тестов и содержанием исследуемых вазоактивных медиаторов и цитокинов (ЭТ-1, NO, ФНОα). Установленное в исследовании нарастание корреляционных взаимосвязей между показателями когнитивных расстройств и уровнем FasL свидетельствует о роли активации апоптоза в развитии нейродегенеративных расстройств у больных АГ II–III ст.

Таким образом, полученные данные подтверждают гипотезу, что длительное существование АГ включает основные механизмы развития хронического нейродегенеративного процесса в ткани головного мозга, состоящие из иммунного воспаления, изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера, эндотелиальной дисфункции и апоптоза в сочетании с дефицитом трофических факторов.

Постепенный характер развития когнитивных нарушений у больных АГ требует разработки новых подходов к их ранней диагностике. С этой целью могут быть использованы выявленные изменения молекулярных маркеров, характеризующих функциональные свойства эндотелия сосудистого русла.

Применение подобных взаимосвязей в последующем может служить основой индивидуализации терапевтической тактики у данной категории больных.

Литература

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. — М.: Медицина, 2001.
2. Дамулин И.В. Легкие когнитивные нарушения // Consilium medicum. — 2004. — Т. 6, № 2. — С. 149–153.
3. Захаров В.В., Яхно Н.Н. Нарушения памяти. — М.: ГеотарМед, 2003. — С. 150.
4. Захаров В.В., Яхно Н.Н. Когнитивные расстройства в пожилом и старческом возрасте: Методическое пособие для врачей. — М., 2005. — С. 71.
5. Завалишин И.А., Яхно Н.Н., Гаврилова С.И. Нейродегенеративные болезни и старение. — М., 2001.
6. Иванова О.В., Соболева Г.Н., Карпов Ю.А. Эндотелиальная дисфункция — важный этап развития атеросклеротического поражения сосудов // Тер. арх. — 1997. — № 6. — С. 75–78.
7. Лурия А.Р. Основы нейропсихологии. — М.: Издательство МГУ, 1973.

8. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. — 1998. — Т. 63, вып. 7. — С. 992–1006.
9. Рытикова Н.С., Смирнова М.А., Уголькова Н.В. Каталог. Наборы и оборудование для клинической лабораторной диагностики. — 2007. — С. 544.
10. Старчина Ю.А., Парфенов В.А., Чазова И.Е. и др. Когнитивные функции и эмоциональное состояние больных, перенесших инсульт, на фоне антигипертензивной терапии // Журн. неврол. и психиат. им. С.С. Корсакова. Инсульт. — 2005, вып. 15. — С. 39–44.
11. Яхно Н.Н., Левин О.С., Дамулин И.В. Сопоставление клинических и МРТ-данных при дисциркуляторной энцефалопатии. Сообщение 2: когнитивные нарушения // Неврол. ж. — 2001. — Т. 6, № 3. — С. 10–19.
12. Cacciatore F., Abete P., Ferrara N. et al. The role of blood pressure in cognitive impairment in an elderly population // J. of Hypertension. — 2002. — Vol. 15. — P. 0135–0142.
13. Hamet P., Richard L., Dam T. et al. Apoptosis in target organs of hypertension // Hypertension, 1995; 26: P. 642–648.
14. Hoang M.V., Turner A. // Biochem. J., 1997; 327 (Part 1), P. 23–26.
15. Rabizadeh S., Ohj., Zhong L. et al. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor // Science. — 1993, V. 261. — P. 345–348.
16. Johnson G.D., Stevenson T., Ahn K.H. // J. Biol. Chem., 1999; 274(7), P. 4053–4058.
17. Kockx M.M., Knaapen M.W.M. The role of apoptosis in vascular disease // J. Pathol. — 2000; 190: P. 267–280.
18. Launer L.J., Masaki K., Petrovitch H. et al. The association between midlife blood pressure level and late-life cognitive function. The Honolulu-Asia Aging Study. JAMA 1995; 274(23): P. 1846–1855.
19. Mombouli J.-V., Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1999; 31: P. 61–74.
20. Petersen R.C., Smith G.E., Waring S.C. et al. // Arch. Neurol. 1999; 56: P. 303–308.
21. Puddu P., Puddu G.M., Zaca R., Muscari A. Endothelial dysfunction in hypertension // Acta. Cardiol., 2000, 55: 221–232.
22. Ruitenberg A., Skoog I., Ott A. et al. Blood pressure and risk of dementia: results from the Rotterdam study and the Gothenburg H-70 Study // Dement. Geriatr. Cogn. Disord. — 2001; 12(1): 33–39.
23. Shichiri M., Kato H., Marumo F. et al. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells // Hypertension. — 1997; 30: P. 1198–203.
24. Subkowski T., Hillen H., Kroger B., Schmidt M. // J. Immunoassay, 1998; 19(2/3), P. 75–93.
24. Schiffrin E.L., Touyz R.M. // J. Cardiovasc. Pharmacol., 1998; 32 (Suppl. 3), P. 2–13.
25. Schwanzel-Fukuda M., Abraham S., Crossin K.L. et al. Immunocytochemical demonstration of neural cell adhesion molecule (NCAM) along the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in mice // J. Comp. Neurol. — 1992. Jul. 1; 321 (1): 1–18.
26. Starr J.M., Whalley I.J., Inch S., Shering P.A. Blood pressure and cognitive functions in healthy old people // J. Am. Geriatr. Soc. — 1993; 41: P. 153–156.



10 лет успешной работы на службе современной лаборатории

ЗАО "Медицинский сервис" осуществляет поставки оборудования по различным разделам лабораторной диагностики.

Предлагает широкий выбор реагентов и расходных материалов для клинических, биохимических, иммунологических, микробиологических исследований.

Располагает собственной производственной базой по изготовлению медицинской, лабораторной, офисной и домашней мебели.

Мы располагаем собственными складами, укомплектованными расходными материалами и реагентами, условия хранения которых соответствуют всем санитарным нормам и требованиям.

За последние годы ЗАО "Медицинский сервис" признано лучшей фирмой на территории России и стран СНГ по продажам и внедрению систем вакуумного забора крови фирмы "GREINER bio-one" (Австрия).

Мы гарантируем качество, четкость поставок и корректность в деловых отношениях.

тел./факс: (812) 365-60-20, 322-56-52

e-mail: info@med-serv.ru

www.med-serv.ru

Комплексное оснащение
лабораторий ЛПУ и
научных центров мебелью,
медицинским оборудованием,
расходными материалами
и технологиями



ЛЕКЦИЯ. ЧАСТЬ 2

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

А.А. ЖЛОБА

Отдел биохимии НИЦ, кафедра клинической лабораторной диагностики
с курсом молекулярной медицины ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Росздрава»

Резюме. Результатом гипергомоцистеинемии (ГГЦ) и сопряженных нарушений метаболизма являются: прогрессирование атеросклероза и его осложнений, ранняя ишемическая болезнь сердца, периферические болезни сосудов, периодические венозные тромбозы, мозговые дисфункции, прогрессирование болезни Альцгеймера и в качестве неблагоприятных исходов — инфаркт и инсульт. В клинической лабораторной диагностике используется термин «общий гомоцистеин» плазмы крови, который обозначает сумму различных состояний вещества (oГци, tHcy). Очень важным в клинической химии является вопрос о причинах токсических эффектов гомоцистеина (Гци), поскольку известно, что другие серосодержащие молекулы, такие как цистеин или аминоктиолы (глутатион, цистеинилглицин), циркулирующие в больших концентрациях, не оказывают повреждающего действия на эндотелий и другие клетки. В настоящее время продолжается изучение лабораторно-диагностического значения исследования Гци. Возможно, вместо oГци следует определять его фракцию в составе определенных белков плазмы, так как накопление Гци в клетках связано не только со скоростью его генерации, но и с рецепторным эндоцитозом из внеклеточной среды в состоянии лиганда определенных белков. При патологических состояниях наблюдается усиление связывания Гци не только альбумином, но и активированным альфа-2-макроглобулином. Это приводит к усилению накопления Гци в клетках, экспрессирующих **LRP**-рецептор.

Наряду с анализом oГци шире используются другие сопутствующие анализы, включая анализы, проявляющие состояние функции почек, поскольку именно в этом органе происходит утилизация основной части поступившего в кровотоки Гци. Важное место в диагностике занимают также анализы, проявляющие внутриклеточный дефицит витамина В12 в повышении метилмалоновой кислоты. Поскольку ГГЦ часто сопровождается вазомоторной эндотелиальной дисфункцией за счет накопления метилированного аргинина — АДМА, то анализ последнего позволяет определиться с вкладом местных метаболических факторов в развитие артериальной гипертензии.

Ключевые слова: гомоцистеин, гипергомоцистеинемия, метилмалоновая кислота (ММК), асимметричный диметиларгинин (АДМА), малоновый диальдегид (МДА).

LECTURE. PART 2

LABORATORY DIAGNOSIS IN HYPERHOMOCYSTEINEMIA

A.A. ZHLOBA

Biochemistry department of scientific research center, Clinical laboratory diagnostics department
with a course of molecular medicine

State educational institution of higher professional education "Saint-Petersburg Pavlov State Medical
University, Federal Agency for Health Care and Social Development"

Summary. Hyperhomocysteinemia and related metabolic disorders lead to the following pathological conditions: progression of atherosclerosis and its complications, early ischemic heart disease, peripheral vessels disease, periodic venous thromboses, cerebral dysfunctions, progression of Alzheimer disease. Among the unfavourable outcomes of these conditions are myocardial infarction and stroke. In clinical laboratory diagnosis the term "total homocysteine" in plasma is used, this term identifies the total amount of different conditions of substance (tHcy). The most important question in clinical chemistry concerns toxic effects of homocysteine; it is known that other sulfur-containing molecules like cystein and aminothiols (glutathione, cysteinilglycin) circulating in high concentrations in blood, do not have any toxic effect on endothelium and other cells. Currently the significance of homocysteine measurement in clinical laboratory is under the investigation. It is proposed, that instead of total homocysteine its fraction in concrete plasma protein should be used because accumulation of homocysteine in cells is related not only with the rate of its generation but also with receptor-based endocytosis from extracellular medium as a ligand of certain proteins. In pathological conditions the increase of homocysteine binding by not only albumin but also activated alpha-2-macroglobulin is observed. This leads to increase of homocysteine accumulation in cells expressing **LRP**-receptor.

In combination with homocysteine other associated analyses including those related to renal function are often used because the kidney is the organ in which the main part of homocysteine is utilized from the blood flow. The main role in the diagnosis belongs to the analyses revealing the intracellular B12 deficiency and elevation of methylmalonic acid. Due to the fact that homocysteine elevation is often accompanied by vasomotor endothelial dysfunction because of methylated arginine accumulation, analysis of the latter can give possibility to determine the impact of local metabolic factors to development of arterial hypertension.

Key words: homocysteine, hyperhomocysteinemia, methylmalonic acid, asymmetric dimethylarginin, malonic dialdehyde.

2. Выявление гипергомоцистеинемии и сопутствующих нарушений обмена веществ

В семидесятых годах прошлого века появились методы анализа гомоцистеина в безбелковых экстрактах плазмы крови, полученных после закисления. Эти методы не могли удовлетворить клиническую практику из-за большой вариабельности данных, которая возникла за счет связывания гомоцистеина с белками крови и постоянно протекающего процесса перераспределения вещества между фракциями дисульфидов после забора образцов крови получения плазмы и закисленных экстрактов. С середины восьмидесятых годов в практику лабораторного анализа ввели процедуру перевода всех форм гомоцистеина в восстановленное состояние. Лабораторный анализ суммарного содержания всех форм гомоцистеина стал общепринятым при разработке методов и оценке уровней содержания этого вещества в норме и при различных заболеваниях. Для оценки общего гомоцистеина крови (oГци, *tHcy*) использовали преимущественно методы жидкостной и газовой хроматографии. В настоящее время для определения oГци плазмы крови в клинической практике широко используют методы ВЭЖХ и иммунохимического анализа. Большое значение для изучения гипергомоцистеинемий на этапе накопления первичных данных имели методы на основе жидкостной хроматографии. С 1990-х годов по мере накопления данных появилось разделение гипергомоцистеинемий на промежуточные, средние и тяжелые.

Взятие материала, подготовка и хранение образцов

При взятии крови для анализа важно соблюдать ряд условий. Традиционно забирают кровь натощак. В клинической практике используется анализ общего гомоцистеина плазмы крови (o-Гци), обследуемый сдает кровь после примерно 12-часового голодания. Известно, что после приема белковой пищи, содержащей метионин, уровень oГци в крови достигает максимума через 6–8 часов. Затем гомоцистеин медленно с периодом полувыведения 3–4 часа элиминируется из плазмы. Поэтому, в случае если анализ выполняют с утра, ужин накануне должен быть ограничен в белках.

Для последующего получения плазмы крови в пробирки добавляют гепарин, цитрат натрия, оксалат на-

трия, фторид натрия или этилендиаминтетрауксусную кислоту в качестве антикоагулянта. Реже используют другие вещества для предотвращения коагуляции, например, соевый ингибитор трипсина. Плазму крови, предназначенную для анализа o-Гци, получают как можно быстрее после взятия крови. Затягивание отделения эритроцитов и других клеток ведет к высвобождению дополнительных количеств гомоцистеина в плазму за счет разрушения S-аденозил-гомоцистеина. Очень важно проводить забор крови в охлаждаемые пробирки. Для этого их помещают в ледяную баню, пробирку перед процедурой охлаждают и продолжают охлаждать в ходе взятия крови вплоть до отделения форменных элементов и отбора плазмы. После взятия крови для максимального устранения влияний со стороны форменных элементов (во избежания дополнительных порций Гци за счет САГ-гидролазной реакции) необходимо быстро отделить плазму крови. Таким образом, для анализа гомоцистеина, малонового диальдегида или асимметричного диметиларгинина плазму крови получают непосредственно в пункте взятия крови. Чаще других антикоагулянтов используют ЭДТА или цитрат натрия, но в присутствии фторида натрия для нормы показатели общего гомоцистеина в пределах 10% ниже, за счет угнетения САГ. Показано, что уровень oГци снижается в среднем на 6,3% после забора материала у обследуемого, лежавшего 30 мин перед анализом, что также следует учитывать при заборе материала. Анализ гомоцистеина в сыворотке крови не выполняют в основном из-за того, что получение сыворотки занимает больше времени, чем получение плазмы крови.

После отделения плазмы крови особых предосторожностей при транспортировке и хранении материала не требуется. Взятые образцы плазмы крови стабильны длительное время при замораживании от –20 до –30 °С. Для хранения образцов мочи, плазмы или сыворотки крови используют низкотемпературные холодильники (–25 °С, –42 °С, –80 °С) или емкости с жидким азотом.

Не менее важно выполнять требования лабораторной практики при маркировке образцов и ведении журналов, регистрации учета температурного режима хранения образцов. После выполнения анализов образцы следует продолжать хранить в течение обычно 5 лет, для повторения анализа. Повторные анализы бывают необходимыми в связи с контролем качества и правильности

анализа, для оценки воспроизводимости анализа, для изучения изменения показателя в различные сроки хранения или для проведения какого-либо другого анализа.

Анализ гомоцистеина в плазме крови

Диагностическая ценность выявляемого метаболита зависит не только от его роли в патогенезе заболевания, но и от используемой методики анализа, ее воплощения и естественных колебаний параметра в обследуемой популяции. Количественное выявление оГци в плазме крови выполняют, используя ВЭЖХ — анализ с различными способами детектирования, иммунохимические методы, газохроматографический анализ, капиллярный электрофорез, прямую спектрофотометрию после ряда энзиматических стадий. Различные методы анализа оГци в настоящее время продолжают разрабатываться и совершенствоваться с целью получения наиболее точных и воспроизводимых методик, реализованных в коммерческих тест-системах. В связи с большим патохимическим значением реакций связывания HS-групп, изучением влияния транспортных форм Гци в плазме крови на окислительно-восстановительные равновесия других аминотиолов, участие в генерации супероксид-аниона, ковалентных модификаций нативных белков, а также важностью в качестве диагностического маркера разработка и совершенствование методов анализа гомоцистеина приобрели не только актуальность для развития фундаментальной биохимии, но и большое практическое значение. В настоящее время проводят большое количество проспективных и ретроспективных многоцентровых трайлов, используя современные методы анализа гомоцистеина при коррекции гипергомоцистеинемий.

Проводится большая работа по сравнению аналитических достоинств коммерческих тест-систем и референтных методов ВЭЖХ-анализа. При сравнении данных различных методик анализа оГци в плазме крови одного и того же обследуемого, выполненных в одних и тех же условиях взятия крови, но в разное время, получают близкие результаты, сравнивая колебания показателя по данным коэффициента вариации (CV). В пяти лабораториях разные современные методы дали примерно одинаковые CV = 8,1, 7,0, 8,3, 9,0, и 9,4% [11, 12]. Более значительные разбросы данных в какой-либо лаборатории, полученные в разное время для одного и того же обследуемого, не подвергавшегося терапии, следует объяснять недостаточным качеством реализации метода или внутренними недостатками тест-системы или использования оборудования.

Точность метода анализа является очень важной характеристикой методики или того или иного теста. Известно, что в здоровой популяции обследуемых уровень оГци в плазме крови, взятой натощак в одинаковых условиях, в среднем обычно колеблется в диапазоне

CV = 24–34%. На варьирование получаемого значения лабораторного теста оказывает влияние несоблюдение условий взятия, доаналитической обработки исследуемого образца, а также сама методика анализа (принципы и количество этапов) и качество ее реализации за лабораторным столом.

Разновидность метода анализа общего гомоцистеина из числа известных надежных методов выбирают в зависимости от оснащения лаборатории. Существует несколько известных методических подходов и соответствующих комплектов реактивов, позволяющих оценить уровень оГци на различном оборудовании. Широко используется ВЭЖХ-анализ с помощью спектрофотометрического, флуориметрического, электрохимического или масс-спектрометрического встроенного в систему детектора. В диагностических лабораториях часто используют тест-системы для иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализа, реже для прямой спектрофотометрии, используя гомоцистеин в качестве стартового субстрата для серии энзиматических реакций.

Иммунофлуоресцентный анализ определения гомоцистеина и метод ВЭЖХ-анализа дают хорошо совпадающие результаты при анализе одних и тех же образцов ($r = 0,985$, $p = 0,001$). Иммунофлуоресцентный анализ наборами «Abbott» (IMx immunoassay), как и ВЭЖХ, по воспроизводимости в серии анализов и межсерийной невоспроизводимости (imprecision) характеризуются коэффициентом вариации в пределах 5%. Оба эти методических подхода дают хорошую воспроизводимость за счет полноты перевода смешанных дисульфидов гомоцистеина в собственно гомоцистеин в ходе пробоподготовки. При этом методы ВЭЖХ-анализа, использующие дериватизацию по тиоловой группировке гомоцистеина, предпочтительнее, чем методы ВЭЖХ-анализа с дериватизацией по альфа-аминогруппе. Как известно, аминов в образцах крови больше, чем тиолов, в связи с этим следует ожидать более селективное выявление гомоцистеина с получением производных по тиоловой группе. Кроме того, дериватизация по тиоловой группе имеет меньше стадий и меньше компонентов в анализе. Более простым выглядит ВЭЖХ-анализ оГци без дериватизации с использованием электрохимического детектора. В электрохимических вариантах детектирования сохраняют стадию пробоподготовки с восстановлением дисульфидов гомоцистеина. Однако нестабильность восстановленных форм гомоцистеина может приводить к меньшей точности и воспроизводимости анализа. Ключевой проблемой всех видов анализа оГци является воспроизводимый и исчерпывающий перевод различных окисленных форм Гци, имеющихся в плазме крови и других образцах тканей, в одну производную регистрируемую форму. В данной области аналитических исследований до настоящего времени продолжается усовершенствование и модификация методов выявления Гци.

Еще одно преимущество дериватизации по тиоловой группе — одновременное специфичное определение других тиолов — глутатиона и цистеина, а также метаболита глутатиона — цистенилглицина. Для этой цели используют различные химические агенты. Одни позволяют работать с флуоресцирующими дериватами (ABD-F и SBD-F, галогеносульфонилбензофуразаны), другие — выявлять продукт фотометрическим детектированием (DTNB, ДТНБ — дитиобиспаранитробензойная кислота, или реактив Элмана).

В настоящее время предложен дешевый метод, в основе которого лежит спектрофотометрический способ детектирования продуктов взаимодействия Гци и других аминокислот с ДТНБ.

Хроматографический анализ проводят на жидкостном хроматографе с обеспечением сбора данных с помощью спектрофотометрического детектора при длине волны 330 нм. Для хроматографического разделения цистеина, гомоцистеина, глутатиона и пеницилламина используют колонку (4,6×150 мм), заполненную сорбентом C₈–C₁₈ с зернением 3 или 5 мкм.

К ВЭЖХ-анализу готовят пробы плазмы крови без калибрующих растворов и с ними: 100 мкл рабочей плазмы крови + 50 мкл 0,1 М КН₂РO₄ буферного раствора и 100 мкл рабочей плазмы + 50 мкл калибровочного раствора.

К обоим вариантам предварительно подготовленных рабочих образцов добавляют 20 мкл раствора дитиотреитола, перемешивают и инкубируют в течение 10 минут в термостате при +60°С. Далее добавляют по 100 мкл 10 мМ раствора ДТНБ. После инкубации смеси в течение 5 минут при комнатной температуре добавляют 150 мкл 9%-ного раствора сульфосалициловой кислоты в растворе ЭДТА. Цветные осадки после охлаждения отделяют центрифугированием при 4000 об/мин в течение 5 мин. Бесцветную или желтоватую надосадочную жидкость перед нанесением на колонку фильтруют через мембранный фильтр, типа фильтров фирмы «Миллипор» (США), размером пор 0,2–0,45 мкм. Все манипуляции с экспериментальными образцами проводят в пробирках для микропроб однократного применения объемом 1,5 мл. Образцы с добавленными калибрующими растворами и образцы стандартов в последовательном режиме наносят на колонку хроматографа. Типичная хроматограмма показана на рисунке 5. Другие аминокислоты плазмы крови — цистеин, цистенилглицин — элюируют раньше глутатиона. В связи с этим при необходимости анализировать их следует снижать долю ацетонитрила в элюенте и переходить на более длинные обращеннофазные колонки С18. В указанных условиях аналитический диапазон элюции локализован между 3,5 и 5,0 минутами, в котором четко последовательно разделяются производные глутатиона, гомоцистеина и калибратора в виде пеницилламина.

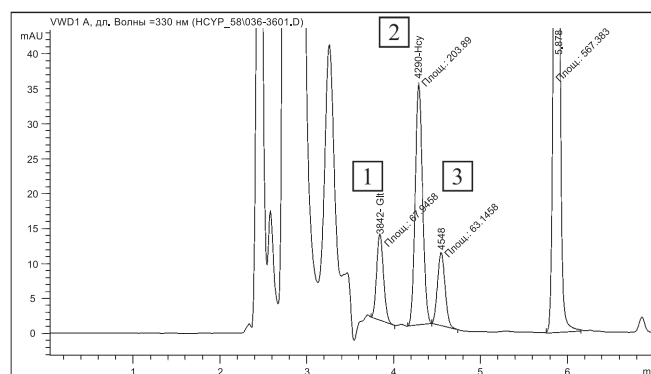


Рис. 5. Разделение ТНБ-производных гомоцистеина (2), калибрующих соединений глутатиона 10 мкМ (1) и пеницилламина 10 мкМ (3), на обращеннофазной колонке C₈ 5μ, 150×4,6 мм в среде ацетонитрил: 0,1М К-фосфатный буфер, pH 3,78 = 9:91; Температура в колоночном отделении — 30°С. Объем ввода — 10 мкл

При выполнении в последовательном режиме 34 анализов различных образцов плазмы крови для колонки время удерживания составило соответственно трем разделяемым производным — 3,80±0,20; 4,22±0,15; 4,52±0,12 мин.

Интервалы сравнения и стандартизация анализа

У лиц в возрасте старше 20 лет гомоцистеин не должен превышать 12–15 мкмоль/л. Однако в ходе витаминотерапии следует добиваться уровня оГци 6–7 мкмоль/л. У детей и беременных женщин уровень оГци не должен превышать 10 мкмоль/л. Различные предложения по интервалам сравнения продолжают обсуждаться. В некоторых лабораториях Северной Европы вовсе не используют какие-либо значения концентраций отсечения для выявления гипергомоцистеинемии, а для сравнения изучаемых образцов в качестве контроля используют значения уровня гомоцистеина в контрольной популяции с применяемой витаминотерапией.

Что касается международного внутреннего стандарта, то в отношении гомоцистеина он до настоящего времени не является универсальным для различных методик. Это затрудняет сравнение результатов полученных различными методами. Сравнение становится более корректным при учете характера восстановления гомоцистеина в ходе пробоподготовки. Это основной этап методики, на который следует обращать особое внимание в анализах и применении контрольных материалов во внешней системе оценки качества анализа. Если методика гарантирует исчерпывающее восстановление различных форм гомоцистеина, то результаты в различных лабораториях будут сопоставимыми. Недовосстановление весьма возможно и приведет не только к занижению результата, но и к увеличению фактора

внутрилабораторного разброса данных. В настоящее время все варианты методов анализа общего гомоцистеина плазмы крови сравнивают с методом ВЭЖХ-анализа, базирующемся, в первую очередь, на детекторах масс-спектрометров.

Другие лабораторные тесты при ведении пациента с гипергомоцистеинемией

Правильное назначение витаминов при ГГЦ можно сделать под контролем анализа крови на оГци. При повышенных уровнях оГци плазмы крови назначают витамины в соответственно возрастающих дозировках: В9 (ФК) – 0,5–5 мг, В6 – 2–5 мг, В12 – 0,02–1 мг. Энтеральные способы коррекции нарушений могут быть неэффективны из-за плохой всасываемости витаминов. Это относится, главным образом, к пациентам в старческом возрасте и к пациентам, перенесшим резекции желудка. Назначение больших доз фолиевой кислоты даже в сопровождении витамина В12 может не устранить функционального дефицита последнего. Существует опасность ослабления внимания к нарастанию клинических последствий В12-дефицита. Неврологические нарушения, проявляющиеся в малых мозговых дисфункциях, по мере развития дефицита витамина В12 усиливаются. При развитии В12 дефицита в организме развивается гематологическая и неврологическая симптоматика, соответствующая болезни Альцгеймера, компрессии спинного мозга, боковому амиотрофическому склерозу, алкогольной и диабетической периферической невропатии. При этом мегалобластическая анемия может быть легко устранена в результате назначения парентеральной В12 терапии. Неврологические нарушения не всегда могут быть устранены, их развитие часто необратимо.

Уровень общего гомоцистеина	Норма < 12 мкмоль/л	Промежуточная 12–25 мкмоль/л	Средняя 25–100 мкмоль/л	Тяжелая > 100–300 мкмоль/л
Дозировки фолиевой кислоты	До 400 мкг/сут	0,4–2 мг/сут	5–10 мг/сут	10 мг/сут

При средних и тяжелых формах ГГЦ ФК назначают по 5–10 мг/сут в течение 2 недель, а затем – по 2 мг/сут в течение неограниченного времени. Через 8 недель после начала лечения нужно повторить измерение уровня Гци. Если он не нормализовался, нужно дополнительно назначать витамины группы В. Лечение препаратами ФК может маскировать гематологические проявления пернициозной анемии, поэтому таким больным показано ежегодное определение уровня ММК.

Для уточнения причины развития гипергомоцистеинемии необходимо выявить зависимость этого состоя-

ния от поступления витамина В12 в клетки организма. Дефицит витамина В12 может возникать вследствие атрофического гастрита, после гастрэктомии или операций гастрального шунтирования, заболеваний поджелудочной железы, мальабсорбции в тонком кишечнике, целиакии, воспалительных заболеваний тонкой кишки. Аутоиммунный компонент в виде антител, блокирующих факторы переноса и транспорта витамина В12 в клетку, может наблюдаться у диабетиков второго типа и у больных с нарушением функции щитовидной железы. Болезни печени могут приводить к В12 дефицитному состоянию вследствие нарушения гепатобилиарной циркуляции витамина в комплексе с гаптокоррином.

В крови витамин В12 транспортируется транскобаламином 2 и гаптокорринами. Гаптокоррин является долгоживущим белком, а транскобаламин является белком с коротким временем полупревращения. Уровень гаптокоррина сильно варьирует. Только транскобаламиновый перенос обеспечивает транспорт витамина в клетку. Гаптокоррин переносит витамин в печень, далее комплекс гаптокоррина с витамином секретируется с желчью, может всасываться и через порталный кровоток опять поступает в печень. Поэтому функциональный дефицит витамина в клетке может наблюдаться как при малых его концентрациях в плазме крови, так и при средних и больших концентрациях. В целом принято считать, что уровень общего витамина В12 в крови ниже 200–300 пикомоль/л плазмы является опасным и приводит к нарушению коферментной функции данного витамина. В виде аденозилкобаламина этот витамин необходим для превращения метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА. Недостаток аденозилкобаламина ведет к значительному повышению содержания в тканях метилмалонил-КоА и его предшественника – пропионил-КоА. В результате при синтезе жирных кислот в нервных клетках образуются и используются для построения структур жирные кислоты не с четным числом атомов углерода, как обычно, а с нечетным. Вследствие этого возникают предпосылки для поражения нервной системы.

Более надежно диагностику В12-дефицитных состояний проводят, анализируя метилмалоновую кислоту (ММК). В 1962 году было показано, что повышение уровня метилмалоновой кислоты связано с недостатком витамина В12 в организме. Только с конца 1970-х годов стали понятными причины связи метилмалоновой ацидемии и ацидурии с дефицитом витамина В12. Этот анализ широко используют в практике клинической биохимии с 1980-х годов в качестве диагностического критерия В12-дефицитных состояний вместо или одновременно с ИФА-анализом транспортных форм витамина В12 в крови.

При нехватке витамина В12 в крови или неэффективном транспорте витамина в клетку происходит повышение уровня ММК выше 0,2 (0,4) мкмоль/л.

Метилмалоновая ацидурия и ацидемия развивается при алиментарной нехватке витамина В12, часто это также состояние недостаточности функции В12-зависимых энзимов. Уровень ММК может возрасти вследствие энзимопатий аденозилкобаламин- и метилкобаламин-зависимых энзимов, а именно, за счет генетических дефектов молекул апоэнзимов. К числу распространенных относится энзимопатия метилмалонил-КоА-мутаза, дефект транскобаламина II, дефицит внутреннего фактора. Все врожденные формы ММК ацидемий являются аутосомно-рецессивными заболеваниями. Алиментарная нехватка этого витамина, приводящая к ММК ацидемии, может встречаться у вегетарианцев. Транзиторная метилмалоновая ацидемия может встречаться у здоровых новорожденных. ММК ацидемия может сопровождаться гипергомоцистеинемией. Определение метилмалоновой ацидемии или -урии позволяет выявить В12 дефицитное состояние с большей надежностью, нежели анализ концентрации самого витамина В12, концентрация которого в норме должна превышать порог в 200 пкМ. Концентрация ММК более точно отражает нарушение метаболизма в тканях. Сама ММК, как вещество, в плазме и сыворотке крови более стабильна, чем производные витамина В12, что облегчает манипуляции при заборе и хранении материала до анализа.

В течение 6 месяцев после начала недостаточного поступления витамина В12 в организм наступает тяжелая метилмалоновая ацидемия и ацидурия. Это состояние может также сопровождаться гипергомоцистеинемией. При назначении парентеральных препаратов витамина В12 (перорально более эффективны препараты аденозилкобаламина и метилкобаламина) наблюдается нормализация как уровня метилмалоновой кислоты, так и концентрации гомоцистеина.

Гипергомоцистеинемия при нормальном уровне ММК часто связана с недостаточностью В9-(фолат)-зависимых энзимов. Назначение повышенных доз фолиевой кислоты приводит уровень гомоцистеина плазмы крови к нормальному состоянию в том случае, если нет приобретенных по наследству энзимопатий. Как известно, энзимопатии метилентетрагидрофолатредуктазы являются наиболее распространенными.

В тканях почек представлен путь метаболизма гомоцистеина посредством транссulфирования, ферменты которого содержат производные витамина В6. Активизация этого пути лекарственными формами витамина В6 также положительно отражается на снижении содержания гомоцистеина в организме.

Нарушение метаболизма гомоцистеина ведет к нарушению образования креатина и соответственно креатинина. Введение в организм креатина в лечебных целях при гипергомоцистеинемии приводит к значительной экономии метионина, снижая суточную потребность в этой аминокислоте, и, соответственно, понижению генерации гомоцистеина. В связи с особенностями обмена креатина в условиях гипергомоцистеинемии лучше

проводить оценку клубочковой фильтрации не по креатинину, а по какому-либо другому веществу. В условиях гипергомоцистеинемии, так же как и в других случаях, измерение скорости клубочковой фильтрации более правильно выявлять по цистатину С. Цистатин С, или цистатин 3 — полипептид, состоящий из 120 аминокислотных остатков. Секретция цистатина С в кровь происходит из клеток с постоянной скоростью пропорционально количеству ядер клеток в организме. Концентрация цистатина С в крови коррелирует со скоростью клубочковой фильтрации. Возрастание концентрации цистатина С в крови пациентов старшей возрастной группы является признаком неблагоприятного развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Для коррекции процессов метилирования назначают комплекс средств, способствующих реметилированию и замещению промежуточных и целевых продуктов обмена серосодержащих аминокислот:

- 1) Триметилглицин содержится в свекле, в чистом виде назначают 1000 мг в сутки,
- 2) Холин в виде холинбитафрата или фосфатидилхолина — 100 мг,
- 3) Таурин — 100 мг,
- 4) Фолиевая кислота — 1000–800 мкг,
- 5) Витамин В12 (в виде метилкобаламина) — 100 мкг, по показаниям парентерально в виде аденозилкобаламина или метилкобаламина,
- 6) Витамин В6 (пиридоксин хлорид, пиридоксаль-5-фосфат) — 10 мг,
- 7) Магния глицинат — 150 мг,
- 8) Цинка монометионат — 7,5 мг,
- 9) Меди глицинат — 5 мг.

Дополнительно можно по показаниям использовать витамин В15 — пантотеновую кислоту, пангамовую кислоту, липоевую кислоту.

Использование в лечебных целях креатина должно сопровождаться терапией, усиливающей реметилирование и транссulфирование гомоцистеина. Назначение повышенных доз препаратов витамина В9, наряду с препаратами витаминов В12 и В6, используется при лечении гипергомоцистеинемий. Снижение уровня гомоцистеина до нормы должно сопровождаться снижением уровня индикатора оксидативного стресса — малонового диальдегида (МДА) в крови. Определение уровня малонового диальдегида в крови является общепринятым показателем регистрации оксидативного стресса. В норме уровень МДА в крови составляет в среднем $0,72 \pm 0,2$ мкмоль/л. Содержание МДА в плазме крови в норме не должно превышать 1,2 мкмоль/л. При явлениях оксидативного стресса, в дополнение к основной терапии, следует использовать в повышенных дозах препараты липоевой кислоты, коэнзима Q10, токоферола (витамина Е), аскорбиновой кислоты (витамина С), препараты биофлавоноидов и богатые антиоксидантами пищевые добавки.

Рекомендуемая литература

1. Жлоба А.А. Диагностика, патогенез и интерпретация лабораторного исследования при гипергомоцистеинемии // В кн. Клиническая и экспериментальная кардиология / Под ред. чл.-корр. РАМН проф. Е.В. Шляхто. — СПб.: Издательство ООО «Академический медицинский центр». — 2005. — С. 198–208.
2. Жлоба А.А., Никитина В.В. Выявление и лечение гипергомоцистеинемии: Пособие для врачей. — М.: Дружба народов, 2004. — 40 с.
3. Иванова С.Ю., Жлоба А.А., Неворотин А.И., Шляхто Е.В. Рецепторный эндоцитоз нативных и модифицированных липопротеидов как один из ключевых факторов атерогенеза // Ученые записки С.-Петербургского государственного университета им. акад. И.П. Павлова. — 1999. — Т. 4. — № 4. — С. 123–133.
4. Черкас Ю.В. Гипергомоцистеинемия как фактор риска развития ишемической болезни сердца: Автореф. дисс. канд. биол. наук. — СПб. — 2001. — С. 5–6.
5. Черкас Ю.В., Денисенко А.Д. Определение содержания гомоцистеина в плазме крови человека методом изократической обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) // Клин. лаб. диагн. — 2001. — № 5. — С. 35–37.
6. Dayal S., Lentz S.R. ADMA and hyperhomocysteinemia // Vascular Medicine. — 2005. — V. 10. — P. S27–33.
7. Durand P. et al. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease // Lab. Invest. — 2001. — V. 81. — P. 645–672.
8. Magera M.J., Lacey J.M., Casetta B., Rinaldo P. Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry // Clin. Chem. — 1999. — V. 45. — P. 1517–22.
9. Nexø E., Engbaek F., Ueland P.M., Westby C. et al. Evaluation of novel assays in clinical chemistry: quantification of plasma total homocysteine // Clin. Chem. — 2000. — V. 46. — P. 1150–6.
10. Pasas S.A., Lacher N.A., Davies M.I., Lunte S.M. Detection of homocysteine by conventional and microchip capillary electrophoresis/electrochemistry // Electrophoresis. — 2002. — V. 23. — P. 759–66.
11. Rasmussen K., Møller J., Lyngbak M. Within-Person Variation of Plasma Homocysteine and Effects of Posture and Tourniquet Application // Clinical Chemistry. — 1999. — V. 45. — N 10. — P. 1850–1855.
12. Rasmussen K., Møller J. Total homocysteine measurement in clinical practice // Ann. Clin. Chem. — 2000. — V. 37. — N 5. — P. 627–648.
13. Refsum H., Smith A.D., Ueland P.M. et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion // Clin. Chem. — 2004. — Vol. 50, N 1. — P. 3–32.
14. Stabler S.P., Lindenbaum J., Savage D.G., Allen R.H. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency // Blood. — 1993. — V. 81. — P. 3404–13.
15. Zhloba A.A., Blashko E.L. Liquid chromatographic determination of total homocysteine in blood plasma with photometric detection // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. — 2004. — Vol. 800, N 1–2. — P. 275–280.



Издательско-полиграфическая компания "КОСТА"
(812) 445-1002 www.kostaprint.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.

ЗАО «АНАЛИТИКА»: 20 лет деятельности в лабораторной медицине



Компания «Аналитика» была создана в 1989 году с целью внедрения в практику отечественных КДЛ эффективных аналитических технологий.

Основу коллектива компании составляют специалисты, имеющие фундаментальную подготовку в области физики, химии, биологии, электронной и компьютерной техники. Ведущие сотрудники компании имеют ученые степени и инкорпорированы в авторитетные международные сообщества (ААСС и др.). Инженерная служба компании укомплектована специалистами высшей квалификации, имеющими уникальный практический опыт и регулярно проходящими переподготовку за рубежом. ЗАО «Аналитика» — это свыше 2000 кв. м собственных площадей, на которых расположены учебный, инженерно-технический и административный участки, а также лицензированный склад продукции, оснащенный оборудованием для длительного хранения термолабильных реагентов. «Аналитика» лицензирована на фармацевтическую деятельность и техническое обслуживание медицинской техники, коллектив компании в настоящее время насчитывает более 100 сотрудников.

«Аналитика» ведет активную деятельность в следующих направлениях:

- обеспечение лабораторий анализаторами, наборами диагностических реагентов и расходными материалами, а также программными продуктами;
- информационно-методическая и техническая поддержка деятельности КДЛ (обучение персонала, обеспечение информационно-методическими материалами, техническое обслуживание оборудования);
- научно-методическая работа (выпуск пособий, статей, проведение семинаров и проч.).

«Аналитика» эксклюзивно представляет в РФ продукцию таких известных производителей, как «Human GmbH», «Euroimmun AG» и «R-Biopharm AG» (Германия), «Medica Corp.» (США), «Drew Scientific» (Великобритания—США), «Mallinckrodt Baker B.V. — J.T. Baker» (Нидерланды), «Trinity Biotech» (Ирландия) и др.

Продукция компании «Human» используется в РФ с 1994 года и имеет широчайшую известность благодаря высокому качеству и доступности для большинства КДЛ — так, например, использование биохимических наборов «Human» стало фактически стандартным в практике отечественных КДЛ.

С 1997 года «Аналитика» поставляет в РФ реагенты и контрольные материалы марки J.T. Baker для гематологических анализаторов. За это время накоплен обширный позитивный опыт использования реагентов с различными моделями приборов. Сотни российских КДЛ на практике убедились в том, что использование реагентов J.T. Baker обеспечивает высокое качество исследований, безотказную работу приборов и существенную экономию средств. Реагенты отличаются высокой стабильностью и удобными фасовками, во многих из них отсутствуют токсичные соединения, а «контрольная кровь» J.T. Baker — один из немногих высокостабильных и регулярно поставляемых в РФ контрольных материалов для гематологии.

В 2005 году компания «Medica» предоставила ЗАО «Аналитика» права эксклюзивного дистрибьютора в РФ анализаторов для исследований электролитов и газов крови — EasyLyte, EasyBloodGas и EasyStat. Приборы компании «Medica» получили заслуженное признание благодаря уникальному сочетанию функциональных и ценовых характеристик, в настоящее время их используют более 1000 российских КДЛ.

С 2005 года «Аналитика» эксклюзивно поставляет в РФ продукцию компаний «Euroimmun AG» и «R-Biopharm AG» — уникальный спектр наборов для иммунохимических исследований (ИФА, иммуноблот, иммунофлуоресценция), востребованность которых отечественными КДЛ постоянно растет.

Растущую популярность приобретает и распространяемая ЗАО «Аналитика» в течение ряда лет продукция для коагулологических исследований компании «Trinity Biotech» — коагулометры и расходные материалы марки Amelung, а также реагенты хорошо известных марок Sigma-AMAX, Biopool и Organon Teknika (bioMerieux), объединенные компанией под новой маркой Trini.

С 2006 года одним из значимых направлений в деятельности «Аналитики» стало обеспечение расходными материалами КДЛ, получивших анализаторы по Национальному проекту «Здоровье», в рамках этого направления к поставленным приборам успешно адаптированы биохимические реагенты компании «Human» и гематологические реагенты марки J.T. Baker.

Важнейшим направлением деятельности «Аналитики» является выполнение технического обслуживания оборудования, без которого невозможна бесперебойная работа лабораторий. Инженеры компании принимают на себя заботы по профилактике и ремонту не только приборов, поставляемых «Аналитикой», но и приборов других поставщиков, на которых используются поставляемые «Аналитикой» реагенты.

За годы деятельности «Аналитикой» были проведены в Москве и регионах РФ многочисленные семинары по вопросам лабораторных исследований, в компании прошли обучение сотни работников КДЛ. При участии специалистов компании был подготовлен целый ряд пособий, справочников и нормативно-методических материалов.

В 2008 году число КДЛ, использующих поставляемую «Аналитикой» продукцию, превысило 2000, среди заказчиков — НИИ, диагностические центры, больницы, поликлиники, родильные дома и другие ЛПУ практически во всех регионах РФ. «Аналитика» является одним из крупнейших в России поставщиков продукции

для КДЛ и ежемесячно отгружает более 5 тонн реагентов для клинической биохимии, более 20 тонн реагентов для гематологии, тысячи наборов для иммунохимических исследований и бесприборной экспресс-диагностики, а также биохимические и гематологические анализаторы, коагулометры, анализаторы электролитов и газов крови, анализаторы мочи, ИФА-анализаторы, микроскопы, системы взятия проб, программное обеспечение для ведения контроля качества и лабораторных журналов. Реагенты поставляются с московского склада компании, емкость которого составляет более 60 тонн, что позволяет основную часть заказов исполнять в срочном режиме.

Вся деятельность компании направлена на комплексное решение стоящих перед лабораторной медициной задач, главная из которых, по нашему мнению, — обеспечение востребованного клиникой спектра исследований при их надлежащем качестве. «Аналитика» может гарантировать, что при использовании поставляемых «Аналитикой» реагентов и обслуживании приборов инженерной службой «Аналитики» результаты внутрилабораторного контроля качества в КДЛ будут соответствовать современным требованиям.

В современных экономических условиях ЗАО «Аналитика» и дальше будет прилагать все силы для обеспечения стабильности поставок, сохранения доступности продукции для ЛПУ и оказания всесторонней поддержки отечественной лабораторной службе.

ЗАО «АНАЛИТИКА»

129343, Москва, проезд Серебрякова, д. 2, корп. 1, а/я 93

тел. (495) 737-0363, 748-1169, 748-1168, факс (495) 737-0365

тел. (800) 200-1989 — бесплатная линия для ЛПУ в регионах РФ

www.analytica.ru, info@analytica.ru

