



№ 5 (30) октябрь 2009

КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор:

Эмануэль В. А., д. м. н., проф.

Заместители главного редактора:

Зыбина Н. Н., д. б. н., проф.

Сухоруков В. С., д. м. н., проф.

Директор редакции:

Черединченко 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 №

«Ученый не тот, кто много читает,
а тот, кто читает с пользой».
Аристипп

Уважаемые коллеги!

Одной из граней сегодняшнего этапа развития клинической медицины является результативность применения в лечебно-диагностическом процессе достижений лабораторной диагностики, возможности которой позволяют проводить раннюю диагностику на клеточном и молекулярном уровнях. Высокая диагностическая эффективность лабораторной диагностики является неоспоримым мотивом глубокого изучения основ лабораторной медицины специалистами различных клинических специальностей.

Исторически позиции отечественной медицины обогащать клиническое мышление объективными методами диагностики отчетливо проявились в истории развития лабораторного дела в нашем Университете. Наш вуз одним из первых принял стратегическое направление по совершенствованию преподавания этой дисциплины и созданию творческого диалога между работниками лабораторной службы и клиницистами созданием 12 лет назад профильной кафедры клинической лабораторной диагностики, сформировавшейся на базе курса клинической лабораторной диагностики кафедры госпитальной терапии им. М.В. Черноруцкого, созданного в 1991 году.

Выполняя сложную образовательную функцию в междисциплинарном формате, кафедра инициировала 7 лет тому назад издание научно-практического рецензируемого журнала «Клинико-лабораторный консилиум».

Важным аспектом деятельности редколлегии журнала является расширение международного сотрудничества, в том числе с Международной федерацией клинической химии и лабораторной медицины.

Научно-практический рецензируемый журнал «Клинико-лабораторный консилиум» выполняет важную функцию в системе непрерывного обучения врачей и достигает определенных успехов посредством таких направлений деятельности журнала как научно-методическая, информационная, обучающая и т.д.

Деятельность журнала характеризуется разнообразием научной тематики и актуальностью публикуемых материалов, уровень которых обеспечен авторитетной редакционной коллегией, которая представлена известными специалистами в различных направлениях клинической и лабораторной медицины.

Профессор кафедры госпитальной терапии им. акад. М.В. Черноруцкого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова,

Председатель правления Санкт-Петербургского общества терапевтов имени С.П. Боткина,

Главный редактор журнала «Новые Санкт-Петербургские врачебные ведомости», член-корр. РАМН, з.д.н. РФ, профессор

Г.Б. Федосеев

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,
заведующий городским организационно-методическим
и контрольным отделом по лабораторной диагностике
и метрологии СПб ГУЗ МИАЦ Комитета
по здравоохранению Правительства СПб, 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., профессор

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

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

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

Эмануэль Владимир Леонидович,
заведующий кафедрой клинической лабораторной
диагностики 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, д. м. н.

Каллер Андерс,
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

Thomas BRINKMANN Ass. Prof. Dr., EurClinChem
Corporate Representative at Executive Board of
International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)
Milan, Italy

Томас Бринкманн доцент, доктор, EurClinChem
Корпоративный представитель исполнительного комитета
международной федерации клинической химии (IFCC)
Милан, Италия

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
диагностики СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, д. м. н.

ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО.....	1
РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ, РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ	2
КАЧЕСТВО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	
<i>А.В. Эмануэль, Ю.В. Эмануэль</i>	
ОПТИМИЗАЦИЯ РАБОТЫ С ОРГАНИЗАЦИОННО-РАСПОРЯДИТЕЛЬНОЙ ДОКУМЕНТАЦИЕЙ	4
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА	
<i>С.Н. Пчелина, М.В. Дубина</i>	
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К АТЕРОСКЛЕРОЗУ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА	9
<i>Л.Б. Дрыгина, Н.Е. Корсакова</i>	
РОЛЬ БЕЛКОВ КОСТНОГО МАТРИКСА В РЕГУЛЯЦИИ СОСУДИСТОЙ КАЛЬЦИФИКАЦИИ	14
КОАГУЛОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИКЕ ВРАЧА-КЛИНИЦИСТА	
<i>Н.А. Жирнова, Н.С. Немченко, Н.Н. Зыбина, А.В. Гончаров, Е.В. Дмитриева</i>	
СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ОСТРОГО ПЕРИОДА ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ СОЧЕТАННОЙ ТРАВМЕ	21
<i>Л.А. Авдушкина, Т.В. Вавилова, Н.Н. Зыбина</i>	
МЕТОД ТРОМБОЭЛАСТОГРАФИИ/ТРОМБОЭЛАСТОМЕТРИИ В ОЦЕНКЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА: ПРОШЛОЕ И НАСТОЯЩЕЕ. РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ	26
ЛАБОРАТОРНАЯ И ИНСТРУМЕНТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА: СРАВНЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ И ОГРАНИЧЕНИЙ	
<i>В.В. Вельков</i>	
НЕИНВАЗИВНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ФИБРОЗА. ДО СВИДАНИЯ, БИОПСИЯ?	34
<i>Т.А. Старовойтова, Н.А. Стериополо, В.В. Зайко, Л.П. Мартынкина, В.А. Кутвицкий, А.Е. Туголуков, С.Г. Волощук, Р.Т. Тогузов, Ю.Ю. Венгеров</i>	
ВИДЕОЦИФРОВАЯ РЕГИСТРАЦИЯ: НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	45
<i>Л.П. Мартынкина, Т.А. Старовойтова, Н.А. Стериополо, В.В. Зайко, В.А. Кутвицкий, А.Е. Туголуков, С.Г. Волощук, Ю.Ю. Венгеров</i>	
ИНФОРМАТИВНОСТЬ ЭКСПРЕСС-ЛАТЕКС-ТЕСТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВИДЕОЦИФРОВОЙ РЕГИСТРАЦИИ	56
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	
<i>Б.Ф. Шуляк, А.Н. Радчикова</i>	
ПАНДЕМИЯ ГРИППА H1N1 — ГОТОВЫ ЛИ МЫ К НЕЙ?	63
<i>С.Д. Зайко</i>	
ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ	67
ИНФОРМАЦИЯ	
ПРЕСС РЕЛИЗ 18-ГО КОНГРЕССА МЕЖДУНАРОДНОЙ ФЕДЕРАЦИИ КЛИНИЧЕСКОЙ ХИМИИ. ЧАСТЬ II. КУДА ИДЕШЬ, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА: ЧТО ДЕЛАТЬ С НОВЫМИ БИОМАРКЕРАМИ?	
ШКОЛА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ. ИНФОРМАЦИОННОЕ ПИСЬМО № 1.	
80	

ОПТИМИЗАЦИЯ РАБОТЫ С ОРГАНИЗАЦИОННО-РАСПОРЯДИТЕЛЬНОЙ ДОКУМЕНТАЦИЕЙ

А.В. ЭМАНУЭЛЬ¹, Ю.В. ЭМАНУЭЛЬ²

¹ Российская ассоциация медицинской лабораторной диагностики

² Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины
ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Росздрава»

Резюме. В статье продолжается обсуждение особенности реализации требований стандартов по системам менеджмента качества ИСО 9001:2008 (ГОСТ Р ИСО 9001-2008) в области организационно-распорядительной документации с целью улучшения менеджмента и повышения эффективности деятельности организаций.

Ключевые слова: Стандарты ИСО, системы менеджмента качества, СМК, менеджмент качества в здравоохранении, ГОСТ Р ИСО 9000-2005, ГОСТ Р ИСО 9001-2008, ИСО 9001:2008, документооборот.

OPTIMIZATION OF WORK WITH ORGANIZATIONAL DOCUMENTATION

A.V. EMANUEL¹, JU.V. EMANUEL²

¹ Russian association of medical laboratory diagnosis

² 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"

Summary. In this article we continue discussing the QMS implementation. This time we want to open a conversation in such a common problem — how to organize a documents control system that is in accordance with ISO 9001:2008 requirements and comfortable for the organization, how to make the system not bureaucratic but providing assistance for every employee of the organization.

Key words: ISO standards, quality management system, quality management in health care, State standard ISO 9000-2005, State standard ISO 9000-2008, ISO 9000-2008, documentation.

Всем известно, что система менеджмента качества, созданная в соответствии с требованиями стандартов ИСО 9001 (а также ИСО 13485, ИСО 15189 и др.) — это **документированная** система управления.

Однако при работе согласно требованиям ИСО 9001 обычно встает вопрос — а какова должна быть **степень** этой документированности?

Существует два основных ответа на данный вопрос.

Первый — максимальная степень бюрократии, когда каждый процесс, каждое изменение, каждое событие внутри организации сопровождается документом или записью.

Второй — жесткое выполнение требования стандарта ИСО 9001 по документообороту — наличие политики по качеству, целей по качеству, РК, 6 ДП и требуемых стандартом записей. В этом случае ситуации, выходящие за рамки данных требований, остаются без документов. (Важно понимать, что аудитор не вправе требовать от Вас наличия записей и/или документов¹, выходящих за

рамки однозначных требований стандарта², если Вы можете адекватно доказать, что отсутствие этих записей и/или документов не будет отрицательно сказываться на результативности процессов и качестве продукции.)

Оба эти подхода, как два полюса, имеют свои плюсы и минусы.

При **жесткой документированности процессов**, когда «на каждый чих» — своя бумажка, заметно **увеличиваются сроки выполнения работ, теряется гибкость**. Но при этом, если система поставлена грамотно³, суще-

² Однозначное требование по наличию документа в стандарте ИСО 9001 можно определить, если в тексте стандарта встречается ссылка на пункт 4.2.3, по наличию записи — ссылка на пункт 4.2.4.

³ Существует несколько вариантов бюрократии. Для нужд данной статьи вкратце опишем два из них. Первый, порочный, функционирует по принципу перекладывания ответственности, когда решение любого вопроса требует огромного количества согласований, носящих чисто формальный характер. В данной системе реальная работа практически парализуется, а большинство сотрудников занимается «перекладыванием бумажек». Второй тип бюрократии — когда система согласований носит конструктивный характер, то есть когда задействованные в цепочке принятия решений сотрудники действительно пы-

¹ В рамках данной статьи мы будем использовать два термина: запись и документ, хотя строго говоря, запись является частным случаем документа.

ственно **снижается риск** операционных ошибок, повышается прозрачность процессов, создается основа для сбора статистики по процессам, возникает так называемая **прослеживаемость**⁴.

Второй вариант, когда работа организации документируется только с учетом явно выраженных требований стандарта, — ситуация обратная. **Повышается скорость работ, гибкость, но повышается также и риск совершения ошибок.** Для минимизации этого риска необходимо повышенное внимание уделять **компетенции и лояльности** персонала. Если Вы доверяете своим сотрудникам, уверены в их профессионализме и в том, что они сознательно прикладывают силы к тому, чтобы организация работала успешно, тогда возможно меньшее документирование.

Есть еще один критерий — чем больше организация и **чем больше разных людей вовлечено в процессы**, тем жестче эти процессы должны быть документированы.

В рамках данной статьи мы не будем рассматривать требования к фиксации данных по процессам — к записям. Остановимся на так называемой организационно-распорядительной документации.

К такой документации мы относим:

- приказы,
- распоряжения,
- стандартные операционные процедуры,
- рабочие инструкции,
- должностные инструкции,
- положения по подразделениям,
- служебные записки,
- докладные записки,
- внутриорганизационные письма и т. п.,

то есть всю документацию, которая используется при описании существующих процессов, управлении процессами, при принятии решений, используется для внутреннего обмена информацией, передачи распоряжений и т. п.

Задача специалистов, занятых в проектировании системы такой документации, на наш взгляд, в нахождении некой «золотой середины», когда документы действительно необходимы для эффективной деятель-

ности организации, то есть когда их количество не больше и не меньше того уровня, который позволяет достигнуть поставленных целей с затратой наименьших ресурсов.

На начальном этапе обычно используют следующий подход. Документы, регламентирующие деятельность, создаются тогда и только тогда, когда возникает некая проблема в работе. К примеру, когда курьер не может договориться со службой забора крови о механизме работы. В таких случаях создается документ, регламентирующий детально, кто, что и как должен делать. Это может быть распоряжение, приказ, рабочая инструкция, дополнение к существующему СОПу и т. п.

То есть используется принцип: **есть проблема во взаимодействии — делай документ.**

Давайте рассмотрим этот пример дальше. Обычно, когда начинают работать по этой схеме, через некоторое время возникает такая ситуация: если на первых порах идет документирование рутинных операций, где в принципе все понятно и нужно просто раз и навсегда начальной рукой принять решение, что и как делать и кто за это несет ответственность, то тут все просто. Но чем дальше, тем в более сложные процессы пытаются внести ясность. И тут возникает ситуация, когда **принятые руководителями решения не срабатывают** — нужно **привлекать персонал**. Персонал начинают привлекать, проводя беседы, совещания и т. п. И на какое-то время ситуация налаживается. Но потом возникает следующее. Или у руководства не хватает времени на постоянные обсуждения, или они становятся неэффективными, и тогда начинают вводить систему согласований. То есть, если в процесс, который хотят регламентировать, входят пять отделов, то необходимо получить согласование проекта документа у пяти руководителей. И если после четырех согласований пятый внесет поправку, которая может быть реально нужной, то согласование нужно начинать заново и согласовывать переделанный документ повторно. Если весь персонал организации адекватен и стремится как можно быстрее и конструктивнее решить задачу, возможно, проблемы бы и не было. Но зачастую встречаются люди, которые принципиально не хотят продвижения данного проекта, или, что еще чаще, возникает конфликт интересов, или вносимые изменения становятся все более формальными — кому-то не понравилась одна формулировка, кому-то другая. Такие вещи, в принципе, особенно если в процесс вовлечены сотрудники разных специальностей, не имеющие представления о менеджменте, могут растянуть процесс согласования очень надолго. Что же можно сделать?

Мы активно используем следующие варианты работы:

1. После опроса сотрудников принимается устное решение. Создается распоряжение, подписывается у руководства. Принудительно внедряется в работу на месяц. После чего сотрудникам предлагается

таются добиться повышения эффективности. Именно второй вариант мы называем «грамотным».

⁴ Необходимость прослеживаемости в полной мере проявляется при возникновении претензий со стороны потребителей. Прослеживаемость позволяет воссоздать всю информацию, касающуюся конкретного процесса. Например, если возникает претензия со стороны пациента о неверных результатах анализа, при грамотно внедренной системе документирования лаборатория может поднять всю информацию, касающуюся получения результатов конкретного пациента, начиная с ситуации при заборе материала, заканчивая передачей данных пациенту. Тут можно говорить о необходимости иметь данные о работоспособности измерительного оборудования (калибровки, поверки), о том, какие использовались реагенты, не были ли они просрочены и т. п.

Таблица 1

№	Наименование распоряжения		Принадлежность	Дата	Статус
1	001-2009, О перемещении реагентов между участками отдела сборки	<u>эл. копия</u>	Склад	19.01.09	действителен
2	001-2009, О перемещении реагентов между участками отдела сборки	<u>эл. копия</u>	Участок сборки	19.01.09	действителен
3	003-2009, О хранении накладных	<u>эл. копия</u>	Отдел продаж	29.01.09	действителен
4	003-2009, О хранении накладных	<u>эл. копия</u>	Экспериментальный отдел	29.01.09	действителен
5	003-2009, О хранении накладных		Бухгалтерия	29.01.09	действителен

написать служебные записки с комментариями и предложениями.

2. Тот же принцип, когда после устных бесед создается распоряжение, подписывается и принудительно внедряется. В процессе работы в течение месяца происходит наблюдение за работой, беседы с персоналом. При нахождении расхождений в реальной работе и тем, что написано в распоряжении, оно переделывается. Распоряжение также переделывается в том случае, если оно в чем-то мешает эффективному функционированию процессов. Основное отличие от первого варианта в том, что сотрудники не пишут свои комментарии, а за весь процесс отвечает специалист по качеству. Именно он наблюдает за работой, беседует с сотрудниками. И он же, в случае необходимости, переписывает документ.

Первые два пути кажутся нам наиболее быстрыми, но требуют от ответственного за создание распоряжений знаний во всех анализируемых областях, понимания деталей всех процессов, аналитического мышления, системного подхода.

Возможны еще два варианта действий.

3. Передать всем сотрудникам, которые участвуют в процессе (или только руководителям вовлеченных в процесс подразделений), проект распоряжения. Собрать письменные комментарии к проекту распоряжения. После чего специалист по качеству готовит обновленную редакцию распоряжения, где учитываются все пожелания специалистов, и передает данное распоряжение на согласование высшему руководству.
4. Наконец, четвертый вариант полезно применять, если распоряжение касается очень важного процесса. В этом случае после сбора письменных комментариев к проекту распоряжения собирается совещание с высшим руководством, где в режиме оперативного обсуждения распоряжения принимаются итоговые решения.

Описанные выше приемы — возможные варианты тактического решения проблемы СОЗДАНИЯ распоряжений.

Но в какой-то момент возникает следующая проблема — слишком много процессов документируется. Создается огромное количество всевозможных мини-распоряжений и приказов, регламентирующих мелкие функции, части процессов. Эта гора регламентирующих документов становится настолько неудобной, что многие сотрудники перестают понимать суть написанного. Более того, из-за попыток по частям регламентировать процессы, получается ситуация, когда распоряжения начинают противоречить друг другу.

Один из методов опять-таки тактического решения — создание реестра документов. Такой реестр можно создавать в обычной программе Excel или ее аналогах из пакета Open Office, если в организации нет более серьезного программного обеспечения. Этот реестр может иметь следующий вид (см. табл. 1).

Если реестр документов создается в Excel, необходимо учитывать, что в случае, когда одно распоряжение касается нескольких отделов, название распоряжения необходимо написать столько раз, сколько отделов должны его использовать. Это делается для того, чтобы используя функции автофильтра, можно было легко сделать выборку всех распоряжений, относящихся к конкретному отделу.

Использование специализированного программного обеспечения делает процесс создания реестров документов намного более удобным и простым.

Еще одна проблема — персонал организации настолько привыкает, что каждое действие требует документа, что перестает гибко и быстро реагировать на возникающие ситуации, а в первую очередь обращается к бумагам.

Зачастую вместо реальной работы в организации создается культ документа. Если возникает какая-то проблема, пусть и самая мелкая, которую проще решить

Таблица 2

№	Наименование метода работы	Характеристика	Целесообразность применения с точки зрения добавленной ценности
1	«Принудительное внедрение»	Документ создается специалистом по качеству на основании немногих бесед с сотрудниками или даже исключительно только с высшим руководством. Одобрение документа осуществляется только высшим руководством. Внедрение в работу принудительное	Процесс носит исключительно вспомогательный характер, либо процесс касается функций контроля, и/или финансовых процессов
2	«Частичное вовлечение персонала»	На этапе создания документа персонал привлекается после того, как проект документа составлен, то есть от сотрудников требуется вносить изменения и/или замечания в уже существующий документ (или проект документа)	Вспомогательные процессы; процессы, технология выполнения которых предельно ясна; процессы, где не наблюдается сбоев в работе
3	«Полное вовлечение персонала»	Сотрудники сами готовят проекты документов. Согласование длится «до победного конца». Наиболее эффективный, но одновременно самый сложный вариант	Важные процессы, результат которых оказывает существенное влияние на жизнедеятельность организации и ее клиентов

звонком по телефону, сотрудники начинают писать служебные записки, докладные, которые обрастают объяснительными, требуют времени для изучения и т. п. В итоге, вместо быстрого решения текущих задач, начинают различные внутренние расследования, аудиты, проверки, предложения по оптимизации и т. п.

Каковы возможные первопричины возникновения вышеописанной ситуации и что можно с ними делать?

— Жесткая иерархическая система управления, когда любые вопросы решаются одним-тремя лицами. В этой ситуации документирование каждого шага и попытка создать прозрачную систему, хотя бы на бумаге, дают руководству иллюзию того, что все «ниточки» управления находятся в его руках.

Бороться с этим можно и нужно через передачу полномочий на места.

— Непонимание высшим руководством сути требований стандартов и слепое следование «рекомендациям» аудиторов. Надо понимать, что для аудиторов наличие бумаг, регламентирующих все и вся, — это плюс, так как не надо искать иных «доказательств» соответствия.

По нашему глубокому убеждению, перенос внимания с документов на компетенцию персонала и его мотивацию позволит намного более эффективно решать текущие задачи, в том числе по улучшению процессов. Дайте персоналу организации необходимый набор инструментов — знаний в области оптимизации бизнес-процессов, прозрачную систему полномочий и возможность принимать решения, и создайте работающую, ориентированную на результат систему мотивации, при этом установите, где это необходимо, жесткий контроль над результатами.

Через некоторое время работы такой системы Вы увидите, что возникающие периодически проблемы в бизнес-процессах станут быстро и эффективно решаться самими сотрудниками.

— Неумение описывать процессы.

Большинство сотрудников организаций не умеют грамотно описать процессы. В результате создается огромное количество бумаг, которые каждый сотрудник компании читает по-своему.

Использовать нотации описания процессов, такие как IDEF 0, IDEF3, ARIS, даже примитивные блок-схемы, затруднительно. В первую очередь потому, что это отдельная профессиональная деятельность и обучить даже ключевых руководителей чтению этих нотаций не так-то просто.

Когда необходимо регламентировать какую-либо деятельность, описать процесс, для ликвидации проблем во взаимодействии попробуйте перейти не к описанию самого процесса, а к установке требований для результатов этого процесса. Дайте сотрудникам самим организовать работу так, чтобы достигать этих результатов. После чего пошлите туда специалиста по качеству, чтобы он описал то, как люди достигают этих результатов. Дайте задачу специалисту по качеству — под руководством сотрудника из конкретного подразделения попытаться найти пути улучшения процесса. Поставьте новые цели по процессу. И так далее.

Другой возможный подход, теоретически самый правильный, — начинать детальную проработку и описание всех процессов организации. Этот подход подробно описан в специальной литературе и подходит, к сожалению, далеко не всем организациям. Хотя теоретически, еще раз подчеркнем, является эффективным.

Более эффективный, но в то же время и сложный вариант, — анализировать создаваемые документы с точки зрения их добавленной ценности.

При этом подходе в фокусе анализа стоит продукт того процесса, которого касается создаваемый документ. И рассматривать нужно именно ценность продукта данного процесса. Если вспомнить суть процессного подхода, то под понятием «клиент» имеются в виду минимум две группы: клиент компании в целом и внутренний клиент.

Когда мы анализируем документы с точки зрения добавленной ценности для продукта процесса, мы можем эффективно применять все описанные выше варианты оптимизации документооборота, то есть этот подход дает возможность в каждом конкретном случае выбрать наилучший способ управления документацией.

Обобщим сказанное. Итак, можно выделить следующие основные способы работы с организационно-распорядительной документацией (см. табл. 2).

В заключение хочется обратить внимание на следующие моменты:

1. Персонал практически любой организации на первых порах очень отрицательно относится к самой идее документирования работы. Поэтому на первых порах создание регламентирующей документации полезно поручить специалисту по качеству. При этом надо очень хорошо понимать, что качество этих документов будет достаточно низким. После создания таких документов высшему руководству нужно проявить жесткость — заставить персонал следовать написанным правилам. Цель — показать сотрудникам, что СМК (ИСО, система качества и т. п.) — это не просто красивые слова, а новый стандарт функционирования фирмы. После того, как сотрудники

увидят, что каждый написанный документ воспринимается руководством как нечто важное, они сами начнут активно участвовать в создании этих документов. Потому что работать на основе тех, которые создаются единолично специалистом по качеству, — нереально. А руководство требует. Поэтому лучше самим на местах создать удобные для исполнения документы. Если Вы прошли этот этап, то Вас можно поздравить. Вы вывели свои СМК на новый уровень. Как это можно проверить? Очень просто. Ваши сотрудники стали сами себе писать процедуры и распоряжения.

2. Следующий этап — добиться того, чтобы создаваемые документы не только были удобны сотрудникам, но и выполняли две цели:
 - a. Соответствовали требованиям стандарта.
 - b. Ввели к постоянному повышению качества продукции и процессов.Об этом мы поговорим в следующей статье.

Литература

1. ГОСТ Р ИСО 9001-2008.
2. ИСО 9001:2008.
3. Эмануэль А.В., Осипова О.Н. Менеджмент качества в сфере здравоохранения и социального развития. — Внедрение международных стандартов системы ISO в России — проблемы и перспективы. — 3, 2008, с. 55–58.
4. Эмануэль А.В., Осипова О.Н. Менеджмент качества в сфере здравоохранения и социального развития. — Практика внедрения ИСО 13485:2003 и Директив 98/79/ЕС IVD и 93/42/ЕС MDD. — 4, 2008, с. 46–61.
5. Тарасенко О.А., Эмануэль В.Л., Эмануэль А.В. Менеджмент качества в сфере здравоохранения и социального развития. — Организация работы специалиста по качеству. — 5, 2009, с. 111–117.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К АТЕРОСКЛЕРОЗУ И ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

С.Н. ПЧЕЛИНА^{1,2}, М.В. ДУБИНА¹

¹ ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Росздрава»

² Учреждение Российской академии наук «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, РАН»

Резюме. Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности во многих странах мира, в том числе в России. Молекулярно-генетические исследования последних лет выявили ряд генетических маркеров, ассоциированных с повышенным риском развития атеросклероза, инфаркта миокарда, ишемического инсульта. В настоящем обзоре обсуждается значимость тестирования генетических маркеров развития ССЗ наряду с традиционными факторами риска данных заболеваний. На основании результатов собственных исследований, проведенных в Северо-Западном регионе России, рекомендуется к использованию в клинической практике ряд генетических маркеров.

Ключевые слова: медицинская генетика, ДНК-диагностика, мультифакториальные заболевания, атеросклероз, генетические маркеры.

DIAGNOSTICS OF MOLECULAR GENETIC PREDISPOSITION TO ATHEROSCLEROSIS AND HEART DISEASE

S.N. PCHELINA^{1,2}, M.V. DUBINA¹

¹ I.P. Pavlov State Medical University, Saint-Petersburg

² Учреждение Российской академии наук «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, РАН»

Summary. Coronary-artery disease (CAD) is the main cause of death in many countries including Russia. Molecular-genetics studies of last years revealed genetics markers associated with the development of atherosclerosis, myocardial infarction, ischemic stroke. In present review prognostic value of genetics markers along to traditional risk factors of CAD is being discussed. Based on the results obtained in north-western region of Russia some genetic markers are recommended for clinical practice.

Key words: medical genetics, DNA diagnostics, multifactorial diseases, atherosclerosis, genetic markers.

Поскольку сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности в большинстве развитых стран, профилактика их развития является одной из самых актуальных проблем современного здравоохранения. Социальная значимость формирования групп риска развития ССЗ для проведения своевременных профилактических мероприятий очевидна. В настоящее время для оценки рисков развития ССЗ предложен ряд рискометров. Так, рискометрия по алгоритму SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation) на сегодняшний день является наиболее перспективным инструментом мониторинга факторов риска, эффективности лечения в популяции и на индивидуальном уровне [16, 23]. Использование модели рискометра Framingham может быть рекомендовано организаторам здравоохранения для оценки популяционных рисков ССЗ и их осложнений в динамике. Традиционно в современные рискометры включены широкоизвестные факторы риска развития ССЗ, такие как возраст, пол, индекс массы тела (ИМТ), наличие гипертензии, высокий уровень

общего холестерина и т. п. В настоящее время в некоторые рискометры уже включен такой параметр как наличие ССЗ у родственников. Оценка эффективности использования генетических маркеров для оценки риска развития ССЗ интенсивно обсуждается во всем мире.

Этиология ССЗ остается неизвестной, однако в настоящее время очевидно, что наряду с факторами окружающей среды в формирование предрасположенности к ССЗ вносят свой вклад генетические факторы. Одной из стратегий поиска генетических факторов риска развития мультифакториальных заболеваний в настоящее время является выбор генов-кандидатов, определенные аллельные варианты которых могли бы вносить вклад в развитие заболевания. Аллельный вариант – это одно из альтернативных структурных состояний гена, характеризующееся уникальной последовательностью нуклеотидов [2]. Оно может определяться как заменой одного нуклеотида (однонуклеотидный полиморфизм), так и инсерциями или делециями последовательности нуклеотидов. Как правило, для анализа выбираются

аллельные варианты, ассоциированные с изменением работы (активности) белкового продукта (фермента). Выбор генов-кандидатов проводится на основании анализа метаболических нарушений, известных для изучаемой патологии. Далее изучаются частоты встречаемости аллельных вариантов генов-кандидатов в группах больных и в контроле [1]. Данный подход, позволяющий выявить гены предрасположенности конкретного заболевания, широко используется в мировой практике для поиска генетических факторов риска развития инфаркта миокарда (ИМ), ишемического инсульта (ИИ), атеросклероза.

Существует мнение о том, что кардиология позднее всех других клинических наук ассимилировала идею «новой биологии». Однако в настоящее время сформировалось и активно развивается новое направление — генетическая кардиология [4]. У истоков ее зарождения в России стоял основатель отдела молекулярно-генетических технологий СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Е. И. Шварц. Исследования, направленные на выявление генетических факторов риска развития ССЗ, были начаты им в середине 1990-х гг. [9, 12]. В настоящем обзоре суммируются результаты исследований по выявлению генетических факторов риска развития ИМ, ИИ, атеросклероза, полученные при исследовании популяции Северо-Западного региона России, и приводится сопоставление полученных результатов с мировыми данными.

Инфаркт миокарда

Исследования по выявлению генетических факторов риска развития ССЗ, проводимые в отделе молекулярно-генетических технологий СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, являются продолжением работы, начатой в лаборатории молекулярной генетики человека Петербургского института ядерной физики. Данная работа была инициирована проф. Е.И. Шварцем. За длительное время были созданы банки ДНК больных, перенесших ИМ в молодом возрасте, пациентов с ИИ и ангиографически верифицированным атеросклерозом.

Были выбраны гены-кандидаты, и на вышеуказанных группах больных был исследован их вклад в развитие каждой из патологий. В исследование вошли гены, аллельные варианты которых были ранее ассоциированы либо с повышенным риском развития ССЗ, либо с изменением биохимических параметров, влияющих на развитие соответствующих заболеваний. На основании проведенных исследований выбрана батарея генетических детерминант, определение которых позволяет прогнозировать развитие того или иного заболевания в Северо-Западном регионе России.

С целью выявления генетических факторов риска развития ИМ у мужчин молодого возраста нами было исследовано 29 аллельных вариантов 19 генов, продукты которых участвуют в липидном метаболизме, в плазменном и тромбоцитарном звеньях гемостаза, в системе

вазоконстрикции-вазодилатации (табл. 1) у 206 мужчин, перенесших ИМ в возрасте до 45 лет, и у 195 мужчин, составивших контрольную группу. Было выявлено повышение риска развития ИМ у мужчин молодого возраста при наличии генотипа RR191 гена параоксоназы 1 (RR191PON1), аллеля Pro33 гена субъединицы III α рецептора тромбоцитов IIb/IIIa (PlA2 GPIIIa) и аллеля Met145 гена субъединицы Ib α рецептора тромбоцитов Ib-IX-V (GPIb α) [5]. В группе умерших от повторных ИМ в течение последующих 8 лет (30 мужчин) обнаружилось достоверное накопление аллеля PlA2 GP III α и генотипа RR191 PON1 по сравнению с контролем ($p < 0,04$ и $p < 0,001$, соответственно) [5].

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными. Так, ряд зарубежных исследователей продемонстрировал превалирование аллеля PlA2 гена GPIII α среди пациентов с ИМ [14, 25]. Наличие аллеля PlA2 приводит к усилению сигнальной функции гликопротеинового комплекса IIb/IIIa и ассоциируется с повышенной АДФ-индуцированной агрегацией тромбоцитов *in vitro* [17]. Аминокислотная замена Thr145Met GPIb α локализуется в лейцин-богатом районе гликопротеина GPIb α , ответственном за связывание рецептора с лигандом, и приводит к повышению активности тромбоцитов. Аллель Met145 GPIb α также был ранее ассоциирован с повышенным риском развития артериальных тромбозов [19]. Мета-анализ данных, полученных на различных популяциях, выявил достоверную ассоциацию аллеля 191R гена PON1 с повышенным риском развития атеросклероза [15]. Предполагается, что параоксоназа 1, фермент плазмы крови человека, играет важную роль в предотвращении окисления липопротеидов низкой плотности и, таким образом, способствует предотвращению развития атеросклероза [21].

Ишемический инсульт

Заболевания головного мозга, обусловленные атеросклерозом церебральных артерий, занимают третье место среди причин смертности, после ИБС и злокачественных опухолей. По данным Всероссийского центра профилактической медицины, в нашей стране от cerebrovasкулярных заболеваний умирает 25% мужчин и 39% женщин. Частота инсульта колеблется от 460 до 560 случаев на 100 000 населения в год. Среди всех инсультов 80% составляют инсульты ишемического характера. Причем 95% ишемических инсультов и транзиторных ишемических атак связаны с осложнениями эмболического характера, локализующимися в экстракраниальных отделах артериальной системы [3].

Для проведения исследования были собраны образцы крови 147 мужчин и женщин (53,4 и 46,6% соответственно), перенесших ИИ в возрасте от 10 до 60 лет (средний возраст первого инсульта $42,5 \pm 10,4$). В контрольную группу вошло 297 человек с отсутствием в анамнезе ССЗ (58,24 и 41,76% мужчин и женщин соответственно), средний возраст $40,58 \pm 6,32$. С целью изу-

Гены-кандидаты, вошедшие в исследование по выявлению генетических факторов риска развития ССЗ в Северо-Западном регионе России

Ген	Аллельные варианты
Липидный метаболизм	
Аполипопротеин Е (APOE)	E2/E3/E4 полиморфизм
Аполипопротеин СIII (APOC3)	Sst1 полиморфизм, T(–455)C
Липопротеидная липаза (LPL)	N291S, D9N, T(–93)G, S447X
Параоксоназа 1 (PON1)*	Q191R, L54 M, C(–108)T
ABCA1 транспортер (ABCA1)*	C(–17)G, C69T, G(–191)C, ins 319, R219K
Плазменный гемостаз	
Фактор V свертывания крови (F5)*	FVLeiden
Ингибитор активатора плазминогена (PAI-I)*	4G/5G полиморфизм
Протромбин (F2)*	A20210G
Фибриноген (FBG)*	G(–455)A
Фактор VII свертывания крови (F7)*	–323 ins10
Тромбоцитарный гемостаз	
Субъединица IIIa рецептора тромбоцитов IIb/IIIa (GP IIIa)*	Leu33Pro
Субъединица IIb рецептора тромбоцитов IIb/IIIa (GP IIb)	Ile843Ser
Субъединица Ia рецептора тромбоцитов Ia/IIa (GP Ia)	C807T
Гликопротеин Iba (GP Iba)	Thr145Met
Рецептор серотонина 2A (5-HT2A)	T102C
Серотониновый транспортер (SLC6A4)	S/L полиморфизм
Вазоконстрикция-вазодилатация, дисфункции эндотелия	
Ангиотензинпревращающий фермент (ACE)	I/D полиморфизм
Эндотелиальная NO синтаза (NOS3)	4a/4b полиморфизм
Метилентетрагидрофолат редуктаза (MTHFR)*	C677T

* — аллельные варианты, вошедшие в исследование по выявлению генетических факторов развития ИИ

чения основ предрасположенности к ИИ в вышеуказанных группах был проведен анализ распределения 13 аллельных вариантов 9 генов (табл. 2). Было показано, что риск развития ИИ у носителей генотипа RR191 гена *PON1* возрастает в 2,9 раза, а ранних форм ИИ (начало до 45 лет) в 4,2 раза по сравнению с носителями генотипов QQ191 и QR191 [10]. Также было выявлено снижение риска развития ИИ у носителей инсерции –323 ins10 фактора VII свертывания крови (A2 *FVII*) [8]. Известно, что высокий уровень фактора VII является независимым фактором риска развития артериальных тромбозов, особенно в сочетании с курением или артериальной гипертензией [20]. Инсерции 10 нуклеотидов в –323 позиции промоторной области (аллель A2 *FVII*) ассоциированы со снижением уровня фактора VII в крови, и, таким образом, его наличие рассматривается как протективное в отношении развития артериальных тромбозов [18].

Атеросклероз

Атеросклероз является многофакторным заболеванием и развивается на основе тесного взаимодействия

фенотипа больного и факторов среды. Нарушения обратного транспорта холестерина и повышенное перекисное окисление липидов могут приводить к развитию атеросклероза [15, 11]. Мы изучили ассоциацию вариантов ABCA1 транспортера (табл. 1), регулирующего перенос холестерина из клеток на частицы ЛПВП, и параоксоназы 1 (*PON1*), регулирующей степень перекисного окисления липопротеинов, с риском развития атеросклероза. Для проведения исследования были собраны образцы крови 119 пациентов (79% мужчин и 21% женщин) с артериальным стенозом различной степени, обусловленным атеросклерозом и подтвержденным при ангиографическом исследовании. В контрольную группу были включены лица без ССЗ — 305 человек (63% мужчин и 37% женщин). Ангиографическая диагностика атеросклероза проводилась на кафедре факультетской хирургии в Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. академика И. П. Павлова. Риск развития атеросклероза у носителей генотипа RR191 по гену *PON1* возрастает в 3,6 раза (95% I:1,88–6,78, $p=0,001$), ранних форм атеросклероза (развитие заболевания до 45 лет) — в 8,62 раза (95% CI:4,46–16,66,

Риск развития ССЗ при наличии определенных генетических факторов риска

Генетические факторы риска	Риск развития заболевания (OR[95%CI], p)		
	ИМ	ИИ	Атеросклероз
RR191 <i>PON1</i>	2,8 [95%CI: 1,24–6,30] p=0,013	2,8 [95%CI: 1,26–6,63]	3,6 [95%CI: 1,88–6,78]
CC(–108) <i>PON1</i>	0,6 [95%CI: 0,40–0,91]	—	—
PLA2 <i>GPIIIa</i>	1,8 [95%CI: 1,11–2,93]	—	—
Met145 <i>GP Iba</i>	2,0 [95%CI: 1,26–3,16]	—	—
A2 F7	—	0,6 [95%CI: 0,86–0,45]	—
319ins < G <i>ABCA1</i>	—	—	0,6 [95%CI: 0,86–0,35]

p<0,0001) [7]. При многофакторном анализе установлено, что среди общеизвестных факторов (курение, ОХС, Х-ЛПВП) генотип RR191 по гену *PON1* значимо и независимо повышает риск атеросклероза. Необходимо отметить, что повышение риска развития заболевания в 8 раз — это значимое увеличение риска, превосходящее, например, риск развития атеросклероза у заядлых курильщИков табака (риск возрастает в 4 раза). Важно отметить, что наличие аллеля R191 гена *PON1* в гомозиготном состоянии у жителей северо-западного региона России также увеличивает риск развития ИМ и ИИ [6, 10]. Ассоциация генотипа RR191 по гену *PON1* с повышенным риском развития атеросклероза объясняется скорее всего тем, что аллель R191 ассоциирован с низкой эффективностью защиты липидов от перекисного окисления. Ранее in vitro было показано, что ЛПВП носителей генотипа QQ191 по гену *PON1* сохраняли способность защищать липопротеины низкой плотности от перекисного окисления более длительное время, чем ЛПВП носителей генотипов QR191 или RR191 [22]. Рентгено-структурный анализ показал, что замена нейтральной аминокислоты глутамина на положительно заряженную аминокислоту аргинин в 191 положении белка PON1 располагается в непосредственной близости от активного центра фермента [13]. Это может объяснить различную активность Q и R изоформ *PON1*. У носителей аллеля G319 гена *ABCA1* понижен риск развития атеросклероза (OR=0,55, 95%CI: 0,86–0,35, p=0,03) и выявлена меньшая степень артериального стеноза (p=0,017). Таким образом, носительство аллеля G319 гена *ABCA1* является предохраняющим в отношении развития атеросклероза.

Заключение

Суммируя полученные результаты, можно сказать, что при анализе широкого спектра генетических маркеров (табл. 1) выявлено лишь несколько генетических маркеров, влияющих на развитие ССЗ (табл. 2). Подобное наблюдается в ряде зарубежных исследований [24, 26]. Это говорит о сложности выявления генетических маркеров развития мультифакториальных заболеваний, в частности ССЗ. С другой стороны, риск развития атеросклероза и его осложнений значительно возрастал (до 8 раз) при носительстве аллеля R191 гена *PON1*. Важно обратить внимание, что полученные риски у носителей данного маркера сопоставимы с величинами, полученными для параметров, традиционно включаемых в современные рискометры по оценке рисков развития ССЗ.

Принимая во внимание существенный вклад генетических факторов риска в развитие ССЗ и их осложнений, можно рекомендовать для внедрения в клиническую практику исследование генетических детерминант, указанных в таблице 2. Особое внимание следует обратить на гомозиготное носительство аллеля R191 гена *PON1*, поскольку данный генетический маркер ассоциирован с высоким риском развития как атеросклероза, так и его осложнений. Можно предположить, что значимым биохимическим маркером развития атеросклероза может явиться измерение активности параоксоназы 1 в плазме крови.

В то же время, сегодня генетические факторы развития артериальных тромбозов (ИБС, ИМ, ИИ) и атеросклероза выделены не настолько однозначно, как, например, маркеры наследственных тромбофилий. Про-

веденные мета-анализы для всех исследованных в настоящей работе факторов риска развития ИМ, ИИ и атеросклероза дают их положительную, но слабую ассоциацию с риском развития заболевания (риск развития заболевания возрастает не более чем в 2 раза).

Таким образом, клиницистам следует принимать во внимание, что генетические факторы риска мультифакториальных заболеваний являются лишь предрасполагающими и могут приводить к развитию заболевания лишь в сочетании с другими наследственными и средовыми факторами риска. Результаты ПЦР-диагностики генетических факторов риска развития ССЗ необходимо рассматривать индивидуально для каждого пациента в комплексе с другими видами исследований.

Литература

1. Баранов В.С. Генетические основы предрасположенности к некоторым частым мультифакториальным заболеваниям // Медицинская генетика. — 2004. — Т. 3. — С. 102–112.
2. Геномика — медицине. Научное издание // Под ред. акад. РАМН Иванова В.И. и акад. РАН Киселева Л.Л. — М.: ИКЦ Академкнига, 2005. — 392 с.
3. Покровский А.В., Кияшко В.А. Ишемический инсульт можно предупредить // РМЖ. — 2003. — Т. 11. — С. 691–696.
4. Пузырев В.П. Генетика мультифакториальных заболеваний: между прошлым и будущим // Медицинская генетика. — 2003. — Т. 12. — С. 498–508.
5. Пчелина С.Н., Сироткина О.В., Шейдина А.М. и др. Генетические факторы риска развития инфаркта миокарда у мужчин молодого возраста, проживающих в Северо-Западном регионе России // Кардиология. — 2007. — Т. 7. — С. 29–34.
6. Пчелина С.Н., Кудинов С. В., Беркович О.А., и др. 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. — С. 58–64.
7. Родыгина Т.И., Демина Е.П., Шейдина А.М. и др. Влияние вариантов генов ABCA1 транспортера и параоксоназы 1 на риск развития и тяжесть течения атеросклероза. Регионарное кровообращение и микроциркуляция // 2007. — Т. 4. — С. 21–28.
8. Сироткина О.В., Черкас Ю.В., Меркулова А.В. и др. Генетические нарушения коагуляционного каскада и обмена гомоцистеина в генезе церебрального тромбоза // Медицинский академический журнал. — 2004. — Т. 4. — С. 23–27.
9. Скобелева Н.А., Васина В.И., Волкова М.В. и др. Полиморфизм ДНК в области генов apoB100, apoCIII, apoE, ангиотензин-конвертирующего фермента и показатели липидного спектра у детей и подростков Санкт-Петербурга // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 1997. — Т. 4. — С. 36–40.
10. Шейдина А.М., Пчелина С.Н., Родыгина Т.И. и др. Аллельные варианты генов PON1 и ABCA1 как факторы риска развития ишемического инсульта // Медицинская генетика. — 2006. — Т. 2. — С. 40–44.
11. Attie A.D., Kastelein J.P., Hayden M.R. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis // J. Lipid. Research. — 2001. — V. 42. — P. 1717–1726.
12. Baranovskaya S., Kudinov S., Fomicheva E. et al. Age as a risk factor for myocardial infarction in Leiden mutation carriers // Mol. Genet. Metab. — 1998. — V. 64. — P. 155–157.
13. Bryk B., Moyal-Segal L.B., Podoly E. et al. Inherited and acquired interactions between ACHE and PON1 polymorphisms modulate plasma acetylcholinesterase and paraoxonase activities // J. of Neurochemistry. — 2005. — V. 92. — P. 1216–1227.
14. Carter A.M., Ossei-Gerning N., Wilson I.J., Grant P.J. Association of the platelet PLA polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen B β 448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease // Circulation. — 1997. — V. 96. — P. 1424–1431.
15. Durrington P.N., Mackness B., Mackness M.I. Paraoxonase and Atherosclerosis // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2001. — V. 21. — P. 473–480.
16. Falera F.F., Klersy C., d'Angeli I. et al. Relationship between atherosclerotic plaques and traditional risk factors in people with no history of cardiovascular disease undergoing multi-detector computed coronary angiography // Heart. — 2009. — Apr 29 [Epub ahead of print].
17. Feng D., Lindpaintner K., Larson M.G. et al. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PLA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 1999. — V. 19. — P. 1142–1147.
18. Girelli D., Russo C., Ferraresi C. et al. Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease // N. Eng. J. Med. — 2000. — V. 343. — P. 774–780.
19. Gonzalez-Conejero R., Lozano M., Rivera J. et al. Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib α associated with arterial thrombotic disease // Blood. — 1998. — V. 92. — P. 2771–2776.
20. Heinrich J., Balleisen L., Schulte H. et al. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM study in healthy men // Arterioscler. Thromb. — 1994. — V. 14. — P. 54–59.
21. Mackness B., Durrington P.N., Mackness M.I. The paraoxonase gene family and coronary heart disease // Curr. Opin. Lipidol. — 2002. — V. 13. — P. 357–362.
22. Mackness M.I., Arrol S., Mackness B. et al. Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation // Lancet. — 1997. — V. 349. — P. 851–852.
23. Stenlund H., Lönnberg G., Jenkins P., et al. Fewer deaths from cardiovascular disease than expected from the Systematic Coronary Risk Evaluation chart in a Swedish population // Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. — 2009. — Apr. 7 [Epub ahead of print].
24. Tobin M.D., Braund P.S., Burton P.R. Genotypes and haplotypes predisposing to myocardial infarction: a multilocus case-control study // European Heart J. — 2004. — V. 25. — P. 459–467.
25. Weiss E.J., Bray P.F., Tayback M. et al. A polymorphism of platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis // N. Engl. J. Med. — 1996. — V. 334. — P. 1090–1094.
26. Yamada Y., Izawa H., Ichihara S. et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes // New Engl. J. Med. — 2002. — V. 347. — P. 1916–1923.

РОЛЬ БЕЛКОВ КОСТНОГО МАТРИКСА В РЕГУЛЯЦИИ СОСУДИСТОЙ КАЛЬЦИФИКАЦИИ

А.Б. ДРЫГИНА, Н.Е. КОРСАКОВА

ФГУЗ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины
им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург

Резюме. В статье представлены современные сведения о роли белков костного матрикса в формировании очагов сосудистой кальцификации. Рассмотрены общие молекулярные механизмы процессов атеросклеротической кальцификации и костного ремоделирования. Показана экспрессия модифицированными гладкомышечными клетками остеокальцина, костного сиалопротеина, остеопонтина, остеонектина, коллагена I типа, щелочной фосфатазы, костного морфогенетического белка-2, *Msx-2*, *Cbfa-1*, матриксного *Gla*-белка, остеопротегерина и др.

Ключевые слова: атеросклероз, костное формирование, сосудистая кальцификация, матриксные белки.

THE ROLE OF BONE MATRIX PROTEIN IN VASCULAR CALCIFICATION

L.B. DRYGINA, N.E. KORSAKOVA

Federal State Health Institution «All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine»
EMERCOM of Russia

Summary. The up-date information concerning role of bone matrix proteins in vasculogenesis loci is precented in our work. The clue molecular mechanisms of atherogenic calcification and bone matrix remodeling in vivo have been considered. The modified non striated muscle cells have been shown to express osteocalcin, bone sialoprotein, osteopontin, osteonectin, collagen type I, alkalinephosphatase, bone morphogenic protein-2, *Msx-2*, *Cbfa-1*, matrix *Gla*-protein, osteoprotegerin and some other factors.

Key words: atherosclerosis, bone genesis, atherogenic calcification, matrix proteins.

Наиболее часто очаги эктопической кальцификации локализуются в сосудистой стенке. Различают несколько гистоанатомических вариантов сосудистой кальцификации: атеросклеротическая кальцификация (АК), кальцификация клапанов сердца и меди артерий, среди которых наиболее часто встречается АК [1]. Сегодня АК связывают не только с риском разрыва бляшки и острыми клиническими проявлениями атеросклероза, но и с поддержанием воспалительного процесса, способствующего дальнейшему повреждению эндотелия сосудов и прогрессированию атеросклеротических поражений [2, 3].

Появление современных методов лучевой диагностики позволило доказать, что сосудистая кальцификация не является лишь поздним проявлением атеросклероза, как было принято считать ранее, небольшие депозиты кальция встречаются уже на ранних стадиях атеросклеротического процесса и в ряде случаев могут предвосхищать возникновение сердечно-сосудистых синдромов [4, 5].

Долгое время атерокальциноз рассматривался как необратимый процесс пассивного переноса кальция и фосфата из растворенного состояния в бляшку с последующей кристаллизацией. Не так давно появилась теория регулируемой оссификации как механизма сосудистой кальцификации [2]. Современные работы

показывают, что АК имеет общие молекулярные механизмы с процессом костеобразования [2, 6].

В настоящее время обсуждаются различные способы отложения кальция при атеросклерозе, однако все они связаны с непосредственным участием в этом процессе сосудистых гладкомышечных клеток (СГМК). Согласно [7, 8], отложению в пораженных артериях кристаллов кальция и фосфата в форме гидроксипатита способствует ускоренный апоптоз СГМК, наблюдаемый при некоторых патологических состояниях или старении организма. Авторами [9] показано, что сосудистая кальцификация является результатом активного костеобразования in situ остеобластоподобными клетками, в роли которых выступают СГМК с модифицированным фенотипом. Модифицированные под действием точно не установленных факторов СГМК начинают спонтанно экспрессировать не свойственные для них белки костного матрикса, такие как коллаген I типа и неколлагеновые белки. Гладкомышечные клетки участвуют в остеогенной и хондрогенной дифференцировке, в результате чего формируется кальцифицированный хрящ, который в дальнейшем пронизывают сосуды, образованные de novo.

При гистологических исследованиях кальцификатов в атеросклеротических поражениях были выявлены структурные особенности, имеющие сходство с участками

ми резорбции и ремоделирования трабекулярной кости. Резорбцию костной ткани осуществляют остеокласты, которые представляют собой крупные, многоядерные клетки с характерной щеточной каемкой. Остеокласты экспрессируют тартрат-резистентную кислую фосфатазу, катепсин К, рецепторы кальцитонина, H^+ -АТФазу и карбоангидразу II. В атеросклеротических поражениях по краям кальцификатов также были обнаружены многоядерные клетки, способные продуцировать тартрат-резистентную кислую фосфатазу и катепсин К [10]. Остеокласты происходят от моноцитарной линии гематопоетических клеток. Получены данные, что макрофаги (модифицированные СГМК) под воздействием частиц минерального кальция подвергаются остеокластной дифференцировке. Атеросклеротические поражения, богатые моноцитами и макрофагами, имеют обильный источник преостеокластов. Процесс созревания преостеокластов в остеокласты происходит при наличии моноцитарного колоние-стимулирующего фактора и лиганда рецептора активатора ядерного фактора каппа β (NF κ B) RANKL [11]. Оба эти фактора присутствуют в атеросклеротических поражениях [12]. Растворимый лиганд RANKL является рецептором для остеопротегерина и стимулирует образование зрелых остеокластов.

В настоящее время в атеросклеротических бляшках человека показана экспрессия ряда коллагеновых и неколлагеновых матриксных белков, таких как остеокальцин, костный сиалопротеин, остеопонтин, остеонектин, коллаген I типа, щелочная фосфатаза, костный морфогенетический белок-2, Msx-2, Cbfa-1, матриксный Gla-белок, остеопротегерин и др., являющихся позиционными регуляторами для СГМК [12–18]. Установление роли белков костеобразования в развитии сосудистой кальцификации может стать основой для понимания более тонких механизмов патогенеза атеросклероза и будет способствовать поиску путей, направленных на предотвращение развития данного процесса.

Костная щелочная фосфатаза — функциональный маркер клеток остеобластного фенотипа

Костная щелочная фосфатаза (ЩФ) является функциональным фенотипическим маркером остеобластов и часто используется в качестве молекулярного маркера сосудистой кальцификации. Считается, что ЩФ разрушает ингибиторы кальцификации и гидролизует фосфорные эфиры с образованием свободных фосфатов, которые необходимы для минерализации костной ткани. По-видимому, аналогичным образом под влиянием ЩФ происходит отложение минеральных структур в сосудистой стенке. В эксперименте показано, что классические активаторы АК — морфогенетический белок BMP2 и окисленные ЛПНП — повышают активность ЩФ в культуре СГМК. В результате происходит снижение уровня неорганического пирофосфата, который служит субстратом для ЩФ и мощным ингибитором сосудистой кальцификации [19].

BMP, Cbfa 1, остерикс — ключевые медиаторы остеобластной дифференцировки

Морфогенетические белки BMP, экспрессируемые при развитии костной ткани, являются членами наиболее крупного подкласса суперсемейства трансформирующего фактора роста- β , и все чаще их относят к медиаторам сосудистой кальцификации. Белки BMP2 и BMP4 вовлечены в процесс минерализации и локальную индукцию воспаления, а BMP7, напротив, тормозит процесс отложения кальция в сосудах [20].

Показано, что BMP могут экспрессироваться эндотелиоцитами, пенистыми клетками и СГМК в атеросклеротических поражениях [12, 21, 22]. Ряд исследований связывает усиление экспрессии BMP и кальцификации с некоторыми медиаторами эндотелиальной дисфункции, такими как окислительный стресс [23], турбулентный кровоток [24] и гипоксия [25]. Инкубация СГМК с TNF- α или окисленными ЛПНП значительно усиливает экспрессию BMP2 [26].

Эффекты BMP2 ключевого медиатора кальцификации сосудов достигаются за счет активации ряда остеогенных транскрипционных факторов — Msx2, Cbfa1 и остерикса. Процесс остеогенеза начинается с экспрессии Cbfa1 при повышении концентрации неорганического фосфата [27]. Появление Cbfa1 служит сигналом для начала остеобластной дифференцировки СГМК. Для индукции кальцифицирующего фенотипа Cbfa1 требуется активация транскрипционного фактора остерикса [28, 29]. На мезенхимальных клетках было показано, что Cbfa1 связывается с промотором остерикса и активирует его, модулируя тем самым транскрипцию этого фактора [30]. Кроме того, Cbfa1 осуществляет контроль экспрессии ряда других белков остеобластной дифференцировки, например, остеокальцина, остеопонтина и коллагена I типа [31].

BMP7, напротив, предотвращает переход СГМК к остеобластному фенотипу путем усиления экспрессии гладкомышечного α -актина [32]. В этом процессе принимают участие белки p21 и Smad 6 и Smad 7. У нокаут-мышей по Smad 6 наблюдается обширная эктопическая кальцификация всех слоев сосудистой стенки [33]. В экспериментальных исследованиях по моделированию сосудистой атерокальцификации установлено, что добавление к клеточной культуре BMP7 предотвращало прогрессирование сосудистой кальцификации. Данный эффект коррелировал со снижением экспрессии остеокальцина в атероматозных бляшках и стенке сосудов [34].

Матриксный Gla-белок

Мощным ингибитором кальцификации сосудов является Gla-белок (MGP), синтезируемый хондроцитами и СГМК [35]. MGP поначалу был идентифицирован как белок костного матрикса. Он отличается небольшим размером (Мм 15 кДа) и содержит γ -карбоксиглутамат. Роль MGP в формировании костной ткани

неясна. Известно, что клетки могут использовать MGP для своего прикрепления, но природа этого взаимодействия *in vivo* не исследована [36]. MGP экспрессируется в кости взрослого организма на относительно постоянном уровне [37]. По данным некоторых авторов в норме в небольших количествах он обнаруживается в артериальной стенке [12], а в атеросклеротических бляшках его уровень значительно повышен [38]. Особенно много MGP обнаруживается в хрящевой и сосудистой тканях вокруг зон риска образования кальцификатов и вокруг уже имеющихся очагов отложения депозитов кальция. В здоровых артериях MGP располагается в основном вокруг эластических волокон меди [18]. В ранних атеросклеротических поражениях на стадии липидных полосок MGP был выявлен как в СГМК меди, так и в СГМК интимы и в пенистых клетках макрофагального происхождения, наполненными липидами [12].

Роль MGP в кальцификации сложна. MGP модулирует как клеточную дифференцировку, так и кальцификацию за счет механизмов, которые полностью не выяснены [39–41]. Показано, что MGP может напрямую подавлять формирование кристаллов кальция. Так, у нокаутных по MGP мышей развивалась обширная кальцификация аорты, при которой стенка аорты замещалась кальцифицированным хрящом [42]. У этих же мышей наблюдались остеопения, переломы, малый рост и недостаточная кальцификация ростовой пластинки. Таким образом, более вероятно, что MGP регулирует минерализацию не напрямую, а влияя на дифференцировку СГМК. Недавно было показано, что MGP подавляет дифференцировку гладкомышечных клеток по остеогенному пути за счет связывания мощного фактора остеогенной и хондрогенной дифференцировки, BMP2, тем самым препятствуя его взаимодействию с рецепторами [39, 41, 42]. Таким образом, именно соотношение уровней MGP к BMP2 регулирует отложение эктопического кальция в стенке сосудов и остеогенную дифференцировку СГМК — низкие (менее 1) или высокие (более 15) значения благоприятствуют кальцификации, в то время как промежуточные уровни (от 1 до 15) подавляют этот процесс [41].

Влияние MGP на BMP2 зависит от степени витамин К-зависимого γ -карбоксилирования MGP. При связывании кальция γ -карбоксилированный MGP может подвергаться конформационным изменениям. Это необходимо для образования комплекса MGP/BMP2, который препятствует взаимодействию BMP2 с его рецептором [43]. Риск повышенной кальцификации определяется не количеством MGP, а его недостаточной функциональной активностью из-за нарушения γ -карбоксилирования. MGP, выделенный из кальцифицированных атеросклеротических бляшек крыс, был не полностью γ -карбоксилирован [44]. В аутопсийном материале атеросклерозированных артерий человека также основная часть MGP характеризовалась недостаточным γ -карбоксилированием, в то время как в здоро-

вых артериях большая часть MGP была представлена активной γ -карбоксилированной формой [18]. Нарушенное карбоксилирование MGP может влиять на процесс отложения депозитов кальция в сосудистой стенке. Вероятно, при повышенном образовании MGP в сосудистой стенке в процессе прогрессирования АК молекулы белка не успевают полностью подвергаться витамин К-зависимому карбоксилированию, которое осуществляется с участием γ -карбоксилазы [18]. Установлено, что только γ -карбоксилированная форма MGP переносится в плазме фетуином, другим циркулирующим ингибитором минерализации [45]. Состояния, связанные с недостаточностью витамина К (постменопауза, прием варфарина), могут усиливать сосудистую кальцификацию [2]. В экспериментах на животных продемонстрировано, что введение антагонистов витамина К приводило к развитию артериальной кальцификации [46].

В недавней работе японских исследователей была показана обратная корреляция между степенью кальцификации коронарных артерий и уровнем циркулирующего MGP в сыворотке крови [47]. Вероятно, повышенная экспрессия MGP в зонах кальцификации артерий [38] отражает попытку организма по поддержанию гомеостаза кальция [13, 48]. Также показана слабая генетическая взаимосвязь между полиморфизмом MGP и риском кальцификации бляшек и инфаркта миокарда [49].

Таким образом, MGP, витамин К-зависимый белок, является мощным ингибитором артериальной кальцификации *in vivo*. Повышенное накопление MGP в сосудистом русле и его концентрация в зонах риска образования кальцификатов и уже имеющихся отложений солей кальция может быть тканевым ответом на рост содержания кальция. Низкий уровень циркулирующего MGP и нарушенное γ -карбоксилирование в местах его тканевой экспрессии связаны с развитием и прогрессированием сердечно-сосудистой патологии [18].

Кроме MGP, ключевыми ингибиторами сосудистой кальцификации являются также белки остеоопонтин и остеопротегерин.

Остеопонтин

Остеопонтин (OPN) представляет собой адгезионный фосфорилированный гликопротеин, экспрессируемый некоторыми типами клеток. В костной ткани он является одним из основных неколлагеновых белков костного матрикса и синтезируется остеобластами, остеоцитами и остеокластами [36]. OPN — кислый белок, состоящий приблизительно из 300 аминокислот и содержащий Arg-Gly-Asp (интегриновую последовательность распознавания), так называемую RGD-последовательность и кальций-связывающий сайт [50].

OPN участвует в костном гомеостазе, как подавляя минеральное отложение, так и стимулируя дифференцировку остеокластов и усиливая их активность. Наличие повторов, богатых электроотрицательными остатка-

ми глутаминовой и аспарагиновой кислот, также как и кальций-связывающий сайт, позволяют OPN крепко связываться с гидроксипатитом (НА). OPN является мощным ингибитором процесса минерализации, так как в эксперименте связывание OPN с НА подавляет рост кристаллов НА [50]. OPN также может влиять на АК за счет стимуляции резорбции. Нейтрализация OPN *in vitro* подавляет остеокластогенез, в то время как добавление OPN усиливает остеокластогенез в OPN^{-/-} клетках. По-видимому, OPN играет важную роль в остеокластогенезе. При моделировании остеопороза у мышей, например, при овариэктомии, а также при утрате механической нагрузки на кость, OPN способствует увеличению числа остеокластов и/или их активации. Эти эффекты нарушаются в отсутствие OPN. Показано, что OPN влияет на остеокластогенез, усиливая экспрессию RANKL и снижая экспрессию остеопротегерина (OPG) в стромальных клетках [50]. Связывание OPN с $\alpha_v\beta_3$ интегрином на остеокластах приводит к снижению кальция в цитозоле и активации остеокластической резорбции [51], а также индуцирует экспрессию карбоангидразы II, которая создает кислую среду, необходимую для резорбции [52].

Адгезия клеток остеокластной линии на костном матриксе достигается путем контакта рецепторов интегринов с RGD-последовательностью OPN [36]. В костной ткани OPN в основном встречается во вновь синтезированной минерализованной костной ткани и концентрируется в участках, где встречаются предсуществовавшая и только что сформированная кость [52]. Гистологические и биохимические исследования костной ткани показали, что синтез OPN носит двухфазный характер. Значительная продукция OPN отмечается на ранних стадиях остеогенеза, во время пролиферации, но чаще это происходит до минерализации или одновременно с ней [36]. Кроме того, OPN защищает клетки от апоптоза и способствует выживанию и/или пролиферации способных к адгезии гладкомышечных и эпителиальных клеток [52].

Гистологические исследования [15] показали, что наибольшая концентрация OPN наблюдается в местах образования кальцифицированных атеросклеротических бляшек. В области бляшки OPN экспрессируется макрофагами, СГМК и эндотелиоцитами. На стадии фиброатеромы экспрессия OPN выявляется в пенистых клетках липидного ядра, а в фиброкальцифицированных бляшках — в CD68-позитивных макрофагах, окружающих некротическое ядро, в отложениях минерального кальция и в ламеллярных костных структурах [53]. Экспрессия мРНК OPN присутствовала в СГМК и в костных структурах фиброкальцифицированных бляшек, в остеоцитах и остеобластах [12].

OPN напрямую подавляет кальцификацию в культуре СГМК аорты быка [54], наиболее вероятно, за счет адгезии к кристаллам апатита и блокирования их роста. В экспериментальных исследованиях на мышах на-

блюдалась регрессия кальцификации, сопутствующая накоплению OPN и остеокластоподобных клеток в трансплантированной сердечно-сосудистой ткани. Рекомбинантный OPN вызывает резорбцию эктопической костной ткани, имплантированной в мышцы [55]. У дефицитных по OPN и MGP мышей наблюдается ускоренная кальцификация аорты по сравнению с мышами, дефицитными только по MGP [56]. Таким образом, OPN выполняет роль ингибитора кальцификации.

Недавно показано, что уровень OPN плазмы крови, независимо от традиционных факторов риска, значительно выше у больных с заболеваниями коронарных сосудов и зависит от тяжести состояния [57].

Остеопротегерин

Остеопротегерин (OPG) относится к семейству рецепторов TNF- α и является непрямым ингибитором остеокластогенеза [58]. OPG экспрессируется остеобластами/стромальными клетками и функционирует как растворимый рецептор-«ловушка», который связывает и подавляет RANKL (лиганд рецептора активации NF- κ B), секретируемый этими же клетками. Активация посредством RANKL рецептора RANK на клетках-предшественниках остеокластов необходима для их созревания [59].

Показано, что OPG экспрессируется в культуре СГМК коронарных артерий [60]. В норме OPG и RANKL обнаруживаются в артериях человека, но исключительно в гладкомышечных клетках меди [12]. В ранних атеросклеротических поражениях на стадии липидных полосок экспрессия OPG и RANKL показана в эндотелиальных клетках, выстилающих полость сосудов. На стадии фиброатеромы OPG экспрессировался в СГМК интимы в кромочных областях бляшек, а в фиброкальцифицированных бляшках — по границе костных структур и в клетках воспаления. Напротив, RANKL обнаруживался только в ассоциации с экстраклеточным матриксом, окружающим отложения кальция [12]. Присутствие OPG на границах костных структур доказывает его функцию ингибитора костной резорбции.

Имеются данные, что обработка OPG предотвращает варфарин-индуцированную сосудистую кальцификацию у крыс [61], что указывает на роль OPG как ингибитора сосудистой кальцификации. У дефицитных по OPG мышей наблюдается снижение общей плотности костной ткани с множественными переломами, а также сосудистая кальцификация в некоторых артериях [62]. Результаты первого клинического исследования OPG подтвердили его способность выступать в качестве терапевтического средства, замедляющего остеопороз.

Остеокальцин

Остеокальцин (OC) или костный gla-белок, один из неколлагеновых белков костного матрикса и дентина,

является наиболее специфичным белком костной ткани [36]. ОС представляет собой витамин К-зависимый протеин с Мм около 5700 Да. Первичная структура ОС включает три остатка γ -карбоксиглутаминовой кислоты, связывающих кальций или НА [63]. ОС синтезируется остеобластами и содержится преимущественно в минерализованной костной ткани.

Несмотря на активное изучение остеокальцина, его функция до конца не ясна. Учитывая сродство к кальцию, предполагалось, что ОС может служить посредником в минерализации костного матрикса. Действительно, остеокальцин связан с участками органического матрикса, которые минерализируются непосредственно вслед за секрецией (аналогичная связь была выявлена для костного сиалопротеина). ОС и его фрагменты обладают хемотаксическими свойствами в отношении клеток, являющихся потенциальными предшественниками остеокластов и остеобластов. Имеются предположения об участии ОС в пополнении количества остеокластов и их активации. Показана корреляция между скоростью костного образования, измеренной гистоморфометрически, и уровнем циркулирующего в крови остеокальцина. Остеокальцин сыворотки является биохимическим маркером ремоделирования костной ткани [36].

Показано, что ОС сыворотки повышен у женщин с атеросклерозом аорты [64]. ОС обнаруживается в неповрежденной аорте, экспрессируясь в эндотелиальных клетках, выстилающих полость сосуда. На стадии ранних атеросклеротических поражений (липидные полоски) экспрессия ОС наблюдается также в наполненных липидами пенистых клетках макрофагального происхождения. На стадии фиброатеромы значительная экспрессия ОС отмечается в пенистых клетках липидного ядра. В фиброкальцифицированных бляшках ОС наблюдается в CD68-позитивных макрофагах, окружающих некротическое ядро, и в минеральных отложениях кальция [12]. Таким образом, при прогрессировании атеросклеротических поражений ОС локализуется в кальциевых отложениях, что может указывать на его роль в развитии сосудистой кальцификации.

Фетуин

В противоположность OPN, OPG и MGP, которые функционируют в пределах сосудистой стенки, фетуин, также известный как $\alpha 2$ -гликопротеин Хереманс-Шмида ($\alpha 2$ -Heremans-Schmid glycoprotein, Ahsg), представляет собой циркулирующий ингибитор кальцификации. In vitro фетуин подавляет образование кристаллов гидроксипатита de novo, не оказывая влияния на уже сформированные кристаллы [65]. Экспериментальные данные подтверждают важную роль фетуина в кальцификации; так, у мышей, дефицитных по этому белку, развивается обширная кальцификация мягких тканей миокарда, почек, языка и кожи [66].

Заключение

Белки костного матрикса играют ведущую роль в регуляции процесса сосудистой кальцификации. Функционально их можно разделить на две большие группы: индукторы кальцификации, к которым относятся костная ЩФ, BMP2, BMP4, Cbfa 1, остерикс, и ингибиторы кальцификации – BMP7, MGP, OPN, OPG, фетуин. В норме существует баланс между прокальциевыми и антикальциевыми регуляторными факторами, изменение этого баланса индуцирует нарушения регуляции и, как следствие, – эктопическую кальцификацию. Таким образом, предполагаемые в настоящее время патологические механизмы сосудистой кальцификации обусловлены индукцией остеогенеза и утратой ингибиторов минерализации. Возможно, имеет место более сложное взаимодействие между подавлением и стимуляцией кальцификации. Точные молекулярные и клеточные механизмы, способствующие эктопическому минеральному депонированию, предстоит еще изучить.

Литература

1. Vattikuti R., Towler D.A. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2004. — Vol. 286. — P. 686–E696.
2. Abedin M., Tintut Y., Demer L.L. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications // *Arterioscler. Thromb. Biol.* — 2004. — Vol. 24. — P. 1161–1170.
3. Boström K. Proinflammatory Vascular Calcification // *Circ. Res.* — 2005. — Vol. 96. — P. 1219–1220.
4. Stary H.C. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life // *Eur. Heart J.* — 1990. — Vol. 11 (suppl. E). — P. 3–19.
5. Kondos G.T., Hoff J.A., Sevrukov A. et al. Electron-beam tomography coronary artery calcium and cardiac events: a 37-month follow-up of 5635 initially asymptomatic low- to intermediate-risk adults // *Circulation.* — 2003. — Vol. 107. — P. 2571–2576.
6. Karsenty G. The complexities of skeletal biology // *Nature.* — 2003. — Vol. 423. — P. 316–318.
7. Stary H.C. Composition and classification of human atherosclerotic lesion // *Virchows Arch. Pathol. Anat. Histopathol.* — 1992. — Vol. 421. — P. 277–290.
8. Stary H.C. Composition and classification of human atherosclerotic lesion // *Virchows Arch. Pathol. Anat. Histopathol.* — 1992. — Vol. 421. — P. 277–290.
9. Demer L.L. A skeleton in the atherosclerosis closet // *Circulation.* — 1995. — Vol. 92. — P. 2029–2032.
10. Jeziorska M., McCollum C., Wooley D.E. Observations on bone formation and remodeling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries // *Virchows Arch.* — 1998. — Vol. 433. — P. 559–565.
11. Matsuzaki K., Udagawa N., Takahashi N. et al. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures // *Biochem Biophys Res. Commun.* — 1998. — Vol. 246. — P. 199–204.
12. Dhore C.R., Cleutjens J.P., Lutgens E. et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* — 2001. — Vol. 21. — P. 1998–2003.

13. Shanahan C.M., Proudfoot D., Tyson K.L. et al. Expression of mineralisation-regulating proteins in association with human vascular calcification//J. Kardiol. — 2000. — Vol. 89 (suppl 2). — P. 63–68.
14. Bostrom K., Watson K.E., Horn S. et al. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions//J. Clin. Invest. — 1993. — Vol. 91. — P. 1800–1809.
15. Giachelli C.M., Bae N., Almeida M. et al. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques//J. Clin. Invest. — 1993. Vol. 92. — P. 1686–1696.
16. Ikeda T., Shirasawa T., Esaki Y. et al. Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta//J. Clin. Invest. — 1993. — Vol. 92. — P. 2814–2820.
17. Hirota S., Imakita M., Kohri K. et al. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification//Am. J. Pathol. — 1993. — Vol. 143. — P. 1003–1008.
18. Schurgers L.J., Teunissen K.J., Knapen M.H. et al. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification//Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. — 2005. Vol. 25 (8). — P. 1629–33.
19. Lomashvili K.A., Cobbs S., Hennigar R.A. et al. Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin//J. Am. Soc. Nephrol. — 2004. — Vol. 15. — P. 1392–1401.
20. Wang E.A., Rosen V., D'Alessandro J.S. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation//Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. — 1990. — Vol. 87. — P. 2220–2224.
21. Shin V., Zebboudj A.F., Bostrom K. Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells//J. Vasc. Res. — 2004. — Vol. 41. — P. 193–201.
22. Csiszar A., Smith K.E., Koller A. et al. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factor-alpha, H2O2, and high intravascular pressure//Circulation. — 2005. — Vol. 111. — P. 2364–2372.
23. Mody N., Parhami F., Sarafian T.A., Demer L.L. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells//Free Radic. Biol. Med. — 2001. — Vol. 31. — P. 509–519.
24. Sorescu G.P., Song H., Tressel S.L. et al. Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase//Circ. Res. — 2004. — Vol. 95. — P. 773–779.
25. Bouletreau P.J., Warren S.M., Spector J.A. et al. Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing//Plast. Reconstr. Surg. — 2002. — Vol. 109. — P. 2384–2397.
26. Cola C., Almeida M., Li D., Romeo F., Mehta J.L. Regulatory role of endothelium in the expression of genes affecting arterial calcification//Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2004; 320: 424–427.
27. Steitz S.A., Speer M.Y., Curinga G. et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers//Circ. Res. — 2001. — Vol. 89. — P. 1147–1154.
28. Ducy P., Zhang R., Geoffroy V. et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation//Cell. — 1997. — Vol. 89. — P. 747–754.
29. Suske G. The Sp-family of transcription factors//Gene. — 1999. — Vol. 238. — P. 291–300.
30. Nishio Y., Dong Y., Paris M. et al. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene//Gene. — 2006. — Vol. 372. — P. 62–70.
31. Xiao G., Jiang D., Ge C. et al. Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression//J. Biol. Chem. — 2005. — Vol. 280. — P. 30689–30696.
32. Dorai H., Vukicevic S., Sampath T.K. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro//J. Cell. Physiol. — 2000. — Vol. 184. — P. 37–45.
33. Galvin K.M., Donovan M.J., Lynch C.A. et al. A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system//Nat. Genet. — 2000. — Vol. 24. — P. 171–174.
34. Davies M.R., Lund R.J., Hruska K.A. BMP-7 is an efficacious treatment of vascular calcification in a murine model of atherosclerosis and chronic renal failure//J. Am. Soc. Nephrol. — 2003. — Vol. 14. — P. 1559–1567.
35. Price P.A., Urist M.R., Otawara Y. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone//Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1983. — Vol. 117. — P. 765–771.
36. Риггз Б.Л., Мелтон III Л. Дж. Остеопороз. Пер. с англ. — М.—СПб.: «БИНОМ», «Невский диалект», 2000.
37. Otawara Y., Price P.A. Developmental appearance of matrix GLA protein during calcification in the rat//J. Biol. Chem. — 1986. — Vol. 261. — P. 10828–10832.
38. Shanahan C.M., Cary N.R., Metcalfe J.C., Weissberg P.L. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques//J. Clin. Invest. — 1994. — Vol. 93. — P. 2393–2402.
39. Bostrom K., Tsao D., Shen S. et al. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells//J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — P. 14044–14052.
40. Newman B., Gigout L.I., Sudre L. et al. Coordinated expression of matrix Gla protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival//J. Cell. Biol. — 2001. — Vol. 154. — P. 659–666.
41. Zebboudj A.F., Imura M., Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2//J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277. — P. 4388–4394.
42. Luo G., Ducy P., McKee M.D. et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein//Nature. — 1997. — Vol. 386. — P. 78–81.
43. Wallin R., Cain D., Hutson S.M. et al. Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)//Thromb. Haemost. — 2000. — Vol. 84. — P. 1039–1044.
44. Sweatt A., Sane D.C., Hutson S.M. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats//J. Thromb. Haemost. — 2003. — Vol. 1. — P. 178–185.
45. Price P.A., Fraser J.D., Metz-Virca G. Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase//Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 84. — P. 8335–8339.
46. Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves//Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. — 1998. — Vol. 18. — P. 1400–1407.
47. Jono S., Ikari Y., Vermeer C. et al. Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography//Thromb Haemost. — 2004. — Vol. 91. — P. 790–794.

48. Hao H., Hirota S., Ishibashi-Ueda H. et al. Expression of matrix Gla protein and osteonectin mRNA by human aortic smooth muscle cells// Cardiovasc. Pathol. — 2004. — Vol. 13. — P. 195–202.
49. Herrmann S.M., Whatling C., Brand E. et al. Polymorphisms of the human matrix gla protein (MGP) gene, vascular calcification, and myocardial infarction// Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2000. — Vol. 20. — P. 2386–2393.
50. Standal T., Borset M., Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling// Exp. Oncol. — 2004. — Vol. 26, T. 3. — P. 179–184.
51. Miyauchi A., Alvarez J., Greenfield E.M. et al. Recognition of osteopontin and related peptides by an $\alpha_v \beta_3$ integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts// J. Biol. Chem. — 1991. — Vol. 266. — P. 20369–20374.
52. Steitz S.A., Speer M.Y., McKee M.D. et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification// Am. J. Pathol. — 2002. — Vol. 161. — P. 2035–2046.
53. O'Brien E.R., Garvin M.R., Stewart D.K. et al. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques// Arterioscler Thromb. — 1994. — Vol. 14. — P. 1648–1645.
54. Asou Y., Rittling S.R., Yoshitake H. et al. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone// Endocrinology. — 2001. — Vol. 142. — P. 1325–1332.
55. Wada T., McKee M.D., Steitz S., Giachelli C.M. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin// Circ. Res. — 1999. — Vol. 84. — P. 166–178.
56. Speer M.Y., McKee M.D., Guldberg R.E. et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo// J. Exp. Med. — 2002. — Vol. 196. — P. 1047–1055.
57. Ohmori R., Momiyama Y., Taniguchi H. et al. Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease// Atherosclerosis. — 2003. — Vol. 170. — P. 333–337.
58. Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R. et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density// Cell. — 1997. — Vol. 89. — P. 309–319.
59. Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. Osteoclast differentiation and activation// Nature. — 2003. — Vol. 423. — P. 337–342.
60. Hofbauer L.C., Shui C., Riggs B.L., Dunstan C.R., Spelsberg T.C., O'Brien T., Khosla S. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells// Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2001. — Vol. 280. — P. 334–339.
61. Price P.A., June H.H., Buckley J.R., Williamson M.K. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D// Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. — 2001. — Vol. 21. — P. 1610–1616.
62. Bucay N., Sarosi I., Dunstan C.R. et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification// Genes. Dev. — 1998. — Vol. 12. — P. 1260–1268.
63. Poser J.W., Esch F.S., Ling N.C., Price P.A. Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone// J. Biol. Chem. — 1980. — Vol. 255. — P. 8685–8691.
64. Jie K.S., Bots M.L., Vermeer C. et al. Vitamin K intake and osteocalcin levels in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study// Atherosclerosis. — 1995. — Vol. 116. — P. 117–123.
65. Heiss A., DuChesne A., Denecke B. et al. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles// J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 13333–13341.
66. Ketteler M. Fetuin-A and extraosseous calcification in uremia// Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. — 2005. — Vol. 14. — P. 337–342.

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: vladimirem1@gmail.com

моб. тел. 8-905-229-60-22

Чередниченко Денис Владимирович

e-mail: cheredni1@gmail.com

тел./факс (812) 233-97-26

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ОСТРОГО ПЕРИОДА ТРАВМАТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ СОЧЕТАННОЙ ТРАВМЕ

Н.А. Жирнова, Н.С. Немченко, Н.Н. Зыбина, А.В. Гончаров, Е.В. Дмитриева
Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального
образования «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ,
кафедра военно-полевой хирургии;
Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова
МЧС России, Санкт-Петербург

Резюме. У 159 пострадавших с тяжелой сочетанной травмой, находившихся на лечении в клинике военно-полевой хирургии ВМА им. С.М. Кирова, исследовано состояние системы гемостаза при поступлении, через 8 и 24 часа. В зависимости от клинической формы острого периода травматической болезни пострадавшие разделены на 4 группы: с травматическим шоком, острой дыхательной и острой сердечной недостаточностью, травматической комой. Выявлены различия в динамике показателей гемостаза при различных формах острого периода травматической болезни, определяющие тактику лечения.

Ключевые слова: тяжелая сочетанная травма, клинические формы острого периода травматической болезни, показатели системы гемостаза.

HEMOSTASIS SYSTEM IN DIFFERENT VARIANTS OF ACUTE PERIOD OF TRAUMATIC DISEASE IN SEVERE COMPLICATED TRAUMA

N.A. Jirnova, N.S. Nemchenko, N.N. Zibina, A.V. Goncharov, E.V. Dmitrieva
Federal state institution of higher professional education "S.M. Kirov Medical Military Academy",
Ministry of defense of Russian Federation, Military Surgery Department;
Federal State Institution of Health Care "A.M. Nikiforov All-Russia Center of Emergency and Radiation
Medicine", Ministry of emergency and disaster situations of Russian Federation, Saint-Petersburg

Summary. The study included 159 of patients with severe complicated trauma, admitted to the Military Surgery Department of S.M. Kirov Medical Military Academy. Hemostasis system parameters were analyzed just after admission and in 8 and 24 hours. Depending on the clinical variant of acute period of the traumatic disease all the patients were divided to 4 groups: patients with traumatic shock, acute respiratory and acute cardiac insufficiency and patients with traumatic coma. The differences in hemostasis parameters in patients with different variants of the acute period were found. These differences can determine the treatment tactic.

Key words: severe complicated trauma, clinical variants of acute period of traumatic disease, hemostasis parameters.

Введение

Тяжелые травмы являются одной из трех основных причин смертности, причем у населения в возрасте до 40 лет эта причина выходит на первое место [7]. В основе современной организации медицинской помощи и лечения пострадавших с тяжелыми сочетанными травмами (ТСТ) лежит концепция травматической болезни (ТБ) [2, 8]. Период острых нарушений жизненно важных функций, или острый период травматической болезни (длящийся от 4 до 12 часов от момента травмы) определяет ее дальнейшее течение и проявляется различными формами: травматическим шоком, травматической комой, острой дыхательной и острой сердечной недостаточностью [2]. Целью настоящего исследования было изучить показатели системы гемостаза в остром перио-

де тяжелой сочетанной травмы при различных формах травматической болезни.

Материал и методы. Обследовано 159 пострадавших в возрасте от 23 до 55 лет с тяжелой сочетанной травмой, находившихся на лечении в клинике военно-полевой хирургии Военно-медицинской академии с 2006 по 2008 год. В зависимости от клинических форм острого периода ТБ пострадавшие разделены на 4 группы. В первую группу (травматический шок) вошел 61 пострадавший с систолическим артериальным давлением при поступлении ниже 100 мм рт. ст., с отсутствием острых расстройств дыхания, нарушений функций головного мозга, признаков первичного повреждения сердца. Вторую группу составили 27 пострадавших с острой дыхательной недостаточностью (ОДН), вызванной тяжелой

травмой груди, но не сопровождавшейся повреждением сердца. У них также отсутствовали выраженные нарушения сознания и острая массивная кровопотеря. У пострадавших третьей группы (25 человек) отмечалась первичная острая сердечная недостаточность (ОСН), вызванная прямым повреждением миокарда. Пострадавшие с тяжелыми расстройствами сознания в группу не включались. В четвертую группу вошли 46 пациентов, поступивших с нарушением сознания на уровне сопора или комы и нарушением функций головного мозга. При этом отсутствовали какие-либо источники массивного кровотечения и тяжелые повреждения груди. Все пострадавшие, кроме пациентов с травматической комой, не имели достоверных различий по тяжести повреждений (по шкале ВПХ-П: $10,6-11,7+1,5$ балла) и тяжести состояния (по шкале ВПХ-СП: $28,1-29,8+1,6$ балла) [5]. Усредненная тяжесть повреждений ($16,2 \pm 0,6$) и состояния ($36,4 \pm 1,5$) при коме была более высокой из-за травмы головного мозга и нарушений его регуляторных функций.

У всех пострадавших при поступлении в клинику определяли ориентировочную величину кровопотери [1]. В группе с травматическим шоком она составляла более 1,5 л, у остальных пострадавших — до 1 л.

Также при поступлении, через 8 и 24 ч после травмы проводили общий клинический анализ крови и исследовали показатели системы гемостаза в артериальной и венозной крови: протромбиновое отношение (ПО), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), антитромбин III (АТ III), спонтанный фибринолиз, содержание фибриногена, растворимых фибриномономерных комплексов (РМФК) и D-димера. Контрольную группу составили 25 практически здоровых лиц

в возрасте 25–50 лет, которых обследовали по тем же показателям.

Общий анализ крови производился на гематологическом анализаторе фирмы «Бауег» (Германия). Оценка состояния системы гемостаза проводилась по методикам, приведенным В.П. Балудой с соавторами [3]. Протромбиновое время определялось мануально с помощью наборов Neoplastin Plus фирмы «ROCHE» (Германия). Содержание АТ III определялось фотометрически с помощью наборов фирмы «Dade Behring» (Германия), D-димера — методом латекс-агглютинации с помощью наборов фирмы «ROCHE» (Германия). Количество фибриногена определяли мануально с помощью наборов Multifibren U фирмы «Dade Behring» (Германия).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты и анализ исследований

Результаты настоящих исследований выявили различия в состоянии системы гемостаза в зависимости от клинических форм острого периода ТБ.

В группе с травматическим шоком в момент поступления определялись резкие нарушения, проявлявшиеся коагулопатией потребления (табл. 1). В крови пострадавших отмечались активация фибринолиза ($57,4 \pm 11,3\%$), увеличение ПО ($1,47 \pm 0,08$), удлинение АЧТВ ($58,4 \pm 5,3$ с), тромбоцитопения ($154,5 \pm 11,4 \times 10^9/\text{л}$) и относительная гипофибриногенемия — $2,3 \pm 0,2$ г/л (известно [6], что в ответ на травму содержание в крови острофазовых белков, в том числе и фибриногена, повышается, поэтому его уровень уже с момента поступления пострадавшего в клинику должен превы-

Таблица 1

Показатели гемостаза при травматическом шоке, $M \pm m$ (n = 61)

Показатель, ед. измерения	Контроль	Сроки обследования		
		Поступление	8 часов	24 часа
ПО	$1,00 \pm 0,02$	$1,47 \pm 0,08^*$	$1,33 \pm 0,05^*$	$1,13 \pm 0,05^{*,**}$
Фибринолиз, %	$15,0 \pm 0,8$	$57,4 \pm 11,3^*$	$13,8 \pm 4,4^{**}$	$15,2 \pm 2,4^{**}$
Фибриноген, г/л	$3,0 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2^*$	$2,2 \pm 0,3^*$	$2,8 \pm 0,2$
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$323,0 \pm 7,5$	$154,5 \pm 11,4^*$	$162,0 \pm 20,0^*$	$182,0 \pm 20,0^*$
АТ III, %	$98,1 \pm 3,3$	$69,5 \pm 7,6^*$	$70,2 \pm 7,4^*$	$80,4 \pm 8,2^*$
РМФК, мкг/мл	$17,5 \pm 2,5$	$34,0 \pm 6,0^*$	$42,0 \pm 6,0^*$	$36,0 \pm 2,0^*$
D-димер, мкг/мл	$< 0,5$	$2,1 \pm 0,25^*$	$4,6 \pm 0,37^{*,**}$	$4,3 \pm 0,17^{*,**}$
АЧТВ, с	$40,0 \pm 3,0$	$58,4 \pm 5,3^*$	$46,7 \pm 3,5$	$56,0 \pm 4,6^*$

Примечание: * — различие достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$);

** — различие достоверно с данными при поступлении ($p < 0,05$).

Таблица 2

Показатели гемостаза при острой дыхательной недостаточности, $M \pm m$ ($n = 27$)

Показатель, ед. измерения	Контроль	Сроки обследования		
		Поступление	8 часов	24 часа
ПО	$1,00 \pm 0,02$	$1,26 \pm 0,07^*$	$1,23 \pm 0,06^*$	$1,25 \pm 0,03^*$
Фибринолиз, %	$15,0 \pm 0,8$	$31,6 \pm 7,3^*$	$9,6 \pm 2,6^{*,**}$	$7,1 \pm 0,7^{*,**}$
Фибриноген, г/л	$3,0 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,4^*$	$3,1 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,2$
Тромбоциты, $\times 10^9$ /л	$323,0 \pm 7,5$	$179,6 \pm 7,2^*$	$195,2 \pm 8,7^*$	$212,9 \pm 14,7^*$
АТ III, %	$98,1 \pm 3,3$	$85,9 \pm 6,3$	$83,1 \pm 3,2^*$	$81,0 \pm 7,4$
РФМК, мкг/мл	$17,5 \pm 2,5$	$20,0 \pm 0,6^*$	$45,0 \pm 4,8^{*,**}$	$46,8 \pm 2,4^{*,**}$
D-димер, мкг/мл	$< 0,5$	$3,2 \pm 0,15^*$	$4,7 \pm 0,32^{*,**}$	$3,4 \pm 0,20^*$
АЧТВ, с	$40,0 \pm 3,0$	$52,0 \pm 3,5^*$	$52,0 \pm 4,0^*$	$48,0 \pm 5,9$

Примечание: * — различие достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$);
 ** — различие достоверно с данными при поступлении ($p < 0,05$).

Таблица 3

Показатели гемостаза при острой сердечной недостаточности, $M \pm m$ ($n = 25$)

Показатель, ед. измерения	Контроль	Сроки обследования		
		Поступление	8 часов	24 часа
ПО	$1,00 \pm 0,02$	$1,08 \pm 0,09$	$1,11 \pm 0,14$	$0,90 \pm 0,05$
Фибринолиз, %	$15,0 \pm 0,8$	$20,3 \pm 6,7$	$22,8 \pm 5,6$	$8,7 \pm 0,9^*$
Фибриноген, г/л	$3,0 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,8$	$2,4 \pm 0,5$	$3,2 \pm 0,5$
Тромбоциты, $\times 10^9$ /л	$323,0 \pm 7,5$	$173,4 \pm 6,7^*$	$187,0 \pm 7,4^*$	$195,0 \pm 5,8^{*,**}$
АТ III, %	$98,1 \pm 3,3$	$80,2 \pm 7,0^*$	$75,0 \pm 5,4^*$	$73,0 \pm 3,6^*$
РФМК, мкг/мл	$17,5 \pm 2,5$	$46,0 \pm 0,6^*$	$44,0 \pm 1,2^*$	$40,0 \pm 0,6^*$
D-димер, мкг/мл	$< 0,5$	$1,8 \pm 0,20^*$	$2,5 \pm 0,15^*$	$4,5 \pm 0,15^{*,**}$
АЧТВ, с	$40,0 \pm 3,0$	$35,3 \pm 2,6^*$	$53,0 \pm 2,5^{*,**}$	$58,0 \pm 3,4^{*,**}$

Примечание: * — различие достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$);
 ** — различие достоверно с данными при поступлении ($p < 0,05$).

шать нормальные значения). После адекватного восполнения кровопотери к 8 часам фибринолитическая активность нормализовалась, однако потребление факторов сохранялось. С первых суток определялась I стадия диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) [4]. Уровень АТ III в остром периоде и через 24 часа был резко снижен ($p < 0,05$), а РФМК и D-димера — повышен. АЧТВ отражало проводимую гепаринотерапию (подкожное введение гепарина в суточной дозе 20 000 Ед, поделенное на 4 введения через 6 часов под контролем АЧТВ — 1 раз в день до введения гепарина) [4].

Наиболее глубокие нарушения в системе гемостаза в остром периоде ТБ отмечались у пострадавших с кровопотерей более 2 литров. Активность АТ III в результате выраженного потребления снижалась в среднем на 56% и составляла $43,3 \pm 5,6\%$. Величина спонтанного фибринолиза в среднем равнялась $69,6 \pm 11\%$, в отдельных случаях — 100%. Уровень фибриногена в крови падал до $1,5 \pm 0,1$ г/л, числа тромбоцитов — до $131,3 \pm 13,7 \times 10^9$ /л. Такие изменения характерны для III стадии ДВС, которая и определялась в 73,3% случаев.

При ОДН в момент поступления наблюдалось повышение фибринолитической активности крови в сред-

Таблица 4

Показатели гемостаза при травматической коме, $M \pm m$ ($n = 46$)

Показатель, ед. измерения	Контроль	Сроки обследования		
		Поступление	8 часов	24 часа
ПО	$1,00 \pm 0,02$	$1,30 \pm 0,07^*$	$1,21 \pm 0,07^*$	$1,33 \pm 0,08^*$
Фибринолиз, %	$15,0 \pm 0,8$	$22,5 \pm 3,5^*$	$12,0 \pm 1,9^*, **$	$17,4 \pm 3,1$
Фибриноген, г/л	$3,0 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,18^*$	$2,3 \pm 0,15^*$	$2,5 \pm 0,18$
Тромбоциты, $\times 10^9$ /л	$323,0 \pm 7,5$	$169,7 \pm 4,6^*$	$170,0 \pm 3,4^*$	$173,9 \pm 7,4^*$
АТ III, %	$98,1 \pm 3,3$	$62,8 \pm 9,6^*$	$80,4 \pm 5,0^*, **$	$79,2 \pm 6,2^*, **$
РФМК, мкг/мл	$17,5 \pm 2,5$	$38,0 \pm 3,0^*$	$50,0 \pm 6,0^*$	$32,0 \pm 5,0^*$
D-димер, мкг/мл	$<0,5$	$3,3 \pm 0,25^*$	$5,3 \pm 0,57^*, **$	$4,2 \pm 0,45^*$
АЧТВ, с	$40,0 \pm 3,0$	$46,4 \pm 3,3$	$48,6 \pm 1,9^*$	$53,4 \pm 7,9$

Примечание: * — различие достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$);

** — различие достоверно с данными при поступлении ($p < 0,05$).

нем в 2 раза (спонтанный фибринолиз: $31,6 \pm 7,3\%$), которое, возможно, было вызвано активацией плазминовой системы вследствие повреждения легочной ткани (табл. 2). В ряде случаев наблюдалось потребление факторов свертывания, что подтверждалось удлинением АЧТВ. Через 8 часов после травмы у пострадавших с ОДН развивалась гиперкоагуляция, в 9–14% ассоциированная с I стадией ДВС (содержание РФМК возрастало с $20,0 \pm 0,6$ до $45,0 \pm 4,8$ мкг/мл, D-димера — с $3,2 \pm 0,15$ мкг/мл до $4,7 \pm 0,32$ мкг/мл). Уровень АТ III достоверно не отличался от нормы ($85,9 \pm 6,3\%$). Удлинение АЧТВ соответствовало гепаринотерапии. Сравнительное исследование состояния гемостаза в артериальной и венозной крови у пострадавших с ОДН показало преобладание гемостатического потенциала в артерии, свидетельствовавшее о нарастающей артериальной гиперкоагуляции. В артериальной крови уровень РФМК был выше ($24,8 \pm 2,8$ мкг/мл, $p < 0,05$), а АТ III — ниже ($78 \pm 2,1\%$, $p < 0,05$), чем в венозной крови ($20,2 \pm 2,2$ мкг/мл и $83,1 \pm 3,2\%$ соответственно). Развивавшиеся гемокоагуляционные изменения могли инициировать паренхиматозную дыхательную недостаточность.

При ОСН в момент поступления и через 8 часов отмечалась гиперкоагуляция с увеличением содержания (в среднем) РФМК — в 2,6 раза, D-димера — в 3–5 раз, достоверным снижением АТ III на 18–23%. Фибринолитическая активность не отличалась от нормальных значений (табл. 3). С первых суток гиперкоагуляция усиливалась угнетением противосвертывающих механизмов (АТ III $73,0 \pm 3,6$; $p < 0,01$) и фибринолитической активности ($8,7 \pm 0,9$ — $6,5 \pm 1,1$, $p < 0,05$), трансформи-

руясь в ДВС (I стадию). Удлинение АЧТВ с 8-ми часов после травмы было связано с применением профилактических доз гепарина в реанимационном отделении.

При травматической коме в момент поступления и через 8 часов после травмы отмечалась коагулопатия потребления (табл. 4). Снижение, по сравнению с контрольной группой, числа тромбоцитов ($169,7 \times 10^9$ /л, $p < 0,01$), уровня фибриногена ($2,3 \pm 0,19$ г/л, $p < 0,01$), АТ III ($62,8 \pm 4,6\%$, $p < 0,01$), увеличение ПО ($1,30 \pm 0,07$, $p < 0,05$), удлинение АЧТВ ($48,6 \pm 1,9$ с, $p < 0,05$), увеличение содержания D-димера ($3,3 \pm 0,25$ мкг/мл, $p < 0,05$) и нормальная фибринолитическая активность свидетельствовали о II стадии ДВС. В 18% случаев определялась III стадия ДВС — количество тромбоцитов снижалось до 83 – $115,4 \times 10^9$ /л, фибринолитическая активность повышалась до 32–48%. Следует отметить, что в эти же сроки в яремной вене уровень РФМК был выше ($60,0 \pm 2,4$ мкг/мл), а АТ III — ниже ($58 \pm 3,2\%$), чем в центральной вене ($50,0 \pm 6,0$ мкг/мл и $80,4 \pm 5,0\%$ соответственно), что свидетельствовало о наличии у пострадавших с комой не только системной, но и регионарной (церебральной) гиперкоагуляции.

Заключение

Результаты исследования показали, что травматический шок и сопровождавшие его массивная кровопотеря и реинфузии вызывали коагулопатию потребления с резкой активацией фибринолиза (в среднем в 4,5 раза больше нормы). Активность АТ III при этом падала до критических цифр.

Характерной особенностью ОДН, в отличие от других клинических форм, являлось преобладание гипер-

коагуляции в артериальной крови, которое при угнетении фибринолитической активности могло играть решающую роль в патогенезе респираторного дистресс-синдрома взрослых (РДСВ).

При ОШ в остром периоде развивалась гиперкоагуляция, которая к 1-м суткам усиливалась и соответствовала I стадии ДВС.

Отличительной чертой гемокоагуляционных нарушений при травматической коме была ранняя системная и регионарная гиперкоагуляция. При этом выраженность регионарной гиперкоагуляции более значительна. Нарушение гемокоагуляции при травматической коме, вероятно, вызвано генерацией тромбина тканевым фактором, поступающим в церебральный и системный кровоток из поврежденной мозговой ткани вследствие нарушения гематоэнцефалического барьера. Как известно, именно повышенная и прогрессирующая генерация тромбина индуцирует коагулопатические расстройства.

Таким образом, можно заключить, что нарушения в системе гемостаза определяются клиническими формами острого периода травматической болезни. Следовательно, исследование таких показателей как количество тромбоцитов, фибриноген, растворимые фибрин-мономерные комплексы, активированное частичное тромбопластиновое время, антитромбин III, D-димер и спонтанный фибринолиз имеет важное значение в диагностике этих клинических форм для определения дальнейшей лечебной тактики при тяжелой сочетанной травме. С целью уточнения диагноза и своевременной профилактики осложнений, при наличии факторов риска, целесообразно проводить дополнительные исследования данных

показателей в артериальной крови при острой дыхательной недостаточности и в яремной вене при травматической коме.

Литература:

1. Барашков Г.А. Реакция организма на кровопотерю и диагностика внутренних кровотечений. Дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. (ВМА им. С.М. Кирова. Каф. воен.-полевой хирургии.) — Л., 1953. — 11 с.
2. Гуманенко Е.К. Политравма. Актуальные проблемы и новые технологии в лечении // Тез. докл. международной конф. «Новые технологии в военно-полевой хирургии и хирургии повреждений мирного времени». — СПб., 2006. — С. 4–14.
3. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / В.П. Балуда, З.С. Баркаган, Е.Д. Гольдберг, Б.И. Кузник, К.М. Лаккин. — Томск: Издательство Томского университета, 1980. — 313 с.
4. Нарушения в системе гемостаза при тяжелых ранениях и травмах: диагностика и лечение / Е.К. Гуманенко, Н.С. Немченко, В.В. Бояринцев, С.В. Гаврилин. — СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2006. — С. 25–46.
5. Объективная оценка тяжести травм / Е.К. Гуманенко, В.В. Бояринцев, В.В. Ващенко, Т.Ю. Супрун // Воен.- мед. журн. — 1996. — № 10. — С. 25–34.
6. Патогенетические особенности острого периода травматической болезни. Травматический шок — частное проявление острого периода / Е.К. Гуманенко, Н.С. Немченко, А.В. Гончаров, Э. В. Пашковский // Вестн. хирургии. — 2004. — Т. 163, № 6. — С. 51–54.
7. Соколов В.А. Множественные и сочетанные травмы. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 512 с.
8. Травматическая болезнь и ее осложнения / С.А. Селезнев, С.Ф. Багненко, Ю.Б. Шапот, А.Н. Курыгин — СПб.: Политехника, 2004. — 414 с.

МЕТОД ТРОМБОЭЛАСТОГРАФИИ/ТРОМБОЭЛАСТОМЕТРИИ В ОЦЕНКЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА: ПРОШЛОЕ И НАСТОЯЩЕЕ. РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ

Л.А. АВДУШКИНА, Т.В. ВАВИЛОВА, Н.Н. ЗЫБИНА

ФГУЗ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова
МЧС России, Санкт-Петербург

Резюме. В статье представлен обзор литературы применения тромбоэластографии/тромбоэластометрии в различных областях медицины. На основании обследования 57 условно здоровых людей (из них 42 мужчины и 15 женщин, средний возраст которых составил $49,8 \pm 4,0$) были рассчитаны референтные интервалы по следующим показателям: время коагуляции (CT), время формирования сгустка (CFT), угол альфа (α), максимальная амплитуда (MCF), амплитуда через 5, 10, 15, 20, 25, 30 минут (A5–A30), максимальный лизис (ML), литический индекс (LI), эластичность сгустка (MCE), площадь темограммы через 5, 10, 15 минут (AR5–AR15). Тромбоэластометрия проводилась на приборе «Rotem» (Pentapharm GmbH, Германия). Были выполнены следующие виды тестов: Natem, Extem, Intem, Fibtem.

Ключевые слова: тромбоэластография, тромбоэластометрия, референтные интервалы.

THROMBELASTOGRAPHY/THROMBOELASTOMETRY IN THE ESTIMATION OF HEMOSTASIS SYSTEM: THE PAST AND THE PRESENT. REFERENCE RANGES

L.A. AVDUSHKINA, T.V. VAVILOVA, N.N. ZYBINA

Federal State Health Institution “All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine”
EMERCOM of Russia, S.-Petersburg

Resume. In the article a review of the literature of thrombelastography / thromboelastometry application in various areas of medicine is presented. On the basis of inspection conditionally healthy 57 persons, 42 men and 15 women which middle age is $49,8 \pm 4,0$ years old referential ranges have been calculated on the following indicators: coagulation time (CT), a clot formation time (CFT), Alpha angle (α), maximum clot firmness (MCF), amplitude in 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutes (A5–A30), maximum lysis (ML), lysis index (LI), maximum clot elasticity (MCE), the area of temogramme in 5, 10, 15 minutes (AR5–AR10). Tromboelastometry was spent on device “Rotem” (Pentapharm GmbH, Germany). The following kinds of tests Natem, Extem, Intem, Fibtem have been executed.

Keywords: thrombelastography, thromboelastometry, reference ranges.

Система гемостаза определяет функционирование всех систем и органов человека, обеспечивая поддержание текучести крови и защищая организм от чрезмерной кровопотери при повреждении сосудистого русла.

С конца XIX века и все последующие десятилетия исследователи пытались разгадать механизмы свертывания крови и предпринимали попытки моделирования гемостаза и оценки функциональной способности системы в лабораторных условиях.

Исследования проводились в двух направлениях: с одной стороны — детализация всех участвующих факторов, с другой стороны — оценка системы в целом, как единого функционирующего комплекса.

Второй подход привел к появлению метода тромбоэластографии (ТЭГ), который был предложен Н. Hartert в 1948 г. Тромбоэластограф Н. Hartert представлял собой металлический цилиндр, подвешенный на торсионном стальном подвесе и помещенный в кювету с пробой крови. Электродвигатель сообщал кювете колебательное

движение вокруг вертикальной оси в ту и другую стороны. При свертывании крови между стенками кюветы и цилиндра формировались нити фибрина, вовлекавшие в колебательные движения цилиндр. Процесс регистрировался с помощью зеркала на движущейся ленте фотобумаги. Полученная кривая была названа тромбоэластограммой.

Прибор Н. Hartert обладал рядом эксплуатационных недостатков: он был громоздок и чувствителен к сотрясениям. В связи с этим предпринимались попытки его совершенствования. Были разработаны и отечественные варианты тромбоэластографов: тромбоэластограф И. Блужаса (1961), портативный тромбоэластограф Г.А. Рогунова (1961), З.Г. Арлазорова (1961), Я.П. Юрчишина (1963), В.Л. Крыжановского (1963), К.П. Бутейко (1964), В.М. Панченко и Е.Н. Тарасовой (1964).

Метод ТЭГ привлекал внимание ученых-разработчиков и практических врачей простотой исполнения, возможностью оценить параметры системы гемостаза

в режиме «реального времени» и определить риск кровотечения во время оперативного вмешательства.

В Ленинградском филиале Всесоюзного научно-исследовательского института медицинской промышленности (ВНИИМП) был разработан 4-канальный тромбоэластограф «Тромб-1». Этот прибор позволял проводить измерение одновременно 4 проб крови, в том числе цельной нативной крови и плазмы с различным содержанием тромбоцитов от одного пациента, т. е. дифференцировать влияние тромбоцитов, фибриногена и форменных элементов крови на процесс свертывания. Также в Ленинградском филиале ВНИИМП был разработан метод микротромбоэластографии, основанный на исследовании капиллярной крови.

Однако в связи с несовершенством оборудования (восприимчивость к вибрациям и механическим ударам), трудностью интерпретации результатов, длительностью измерения, сложностью установки и ограниченной подвижностью, плохим документированием результатов метод ТЭГ широкого распространения в те годы не получил.

С конца XX века метод ТЭГ получил второе рождение. Это было связано с разработками новых приборов, основанных на классической тромбоэластографии (компания «Haemoscope», США) и модифицированном методе тромбоэластометрии (ТЭМ) (компания «Pentapharm GmbH», Германия).

Метод ТЭГ/ТЭМ имеет широкие возможности. Он позволяет качественно и количественно охарактеризовать процесс тромбообразования, оценить механические характеристики сгустка, его плотность, стабильность, взаимодействие тромбоцитов и фибринолиз, а также косвенно судить о содержании тромбоцитов в крови.

В отличие от предшествующих моделей новые приборы позволяли исследовать как спонтанную коагуляцию, так и коагуляцию, индуцированную активаторами. Применение различных активаторов (тканевой фактор, тромбин, элаговая кислота) и ингибиторов (гепариназа, цитохалазин D, аprotинин) служит разным диагностическим целям, а также ускоряет время измерения [1]. Так, при ТЭМ исследовании могут быть использованы различные виды тестов в зависимости от используемых индукторов (Natem, Extem, Intem, Fibtem, Neptem тесты).

В настоящее время разработаны компактные ТЭГ/ТЭМ приборы для использования в режиме прикроватной диагностики с размещением непосредственно у постели больного и оценкой процесса гемостаза немедленно после взятия крови. Такой подход существенно уменьшает влияние преаналитических факторов и дает быстрый результат в критических ситуациях.

Исследование на приборах ТЭГ/ТЭМ основано на проведении измерения в камере с чашей, в которую погружен поршень. Чаша и поршень постоянно колеблются относительно друг друга под углом 4,75°. Пока кровь в кювете остается жидкой, поршень не двигается.

При появлении первых признаков свертывания поршень вовлекается в колебательные движения вместе с чашей. Параметры движения оцениваются при помощи оптической системы слежения (ТЭМ) или торсионного привода (ТЭГ). Данные обрабатываются и анализируются компьютером с использованием специального программного обеспечения.

Количественные характеристики, которые рассчитываются автоматически с помощью компьютерной программы и чаще всего применяются для оценки системы гемостаза, представлены в таблице 1 и на рисунке 1.

Таблица 1

Основные показатели ТЭМ/ТЭГ

Параметры	ТЭМ	ТЭГ
Время коагуляции, с	CT	г
Время формирования сгустка, с	CFT	k
Угол альфа, °	α	α
Максимальная амплитуда, мм	MCF	MA
Амплитуда, мм	A	A
Максимальная эластичность сгустка	MCE	G
Максимальный лизис, %	ML	—
Литический индекс, %	LY	CL

CT/г (coagulation time) — время коагуляции. Это время, измеренное от момента внесения реагента до достижения ТЭГ/ТЭМ амплитуды в 2 мм.

CFT/k (clot formation time) — время формирования сгустка. Временной интервал отражает изменение амплитуды ТЭГ/ТЭМ с 2 мм до 20 мм.

α — угол альфа образован продольной осью ТЭГ/ТЭМ и прямой, проведенной по касательной к ТЭГ/ТЭМ из точки, соответствующей амплитуде сгустка 2 мм.

MCF/MA (maximum clot firmness/maximum amplitude) — максимальная твердость сгустка. Показатель соответствует максимальной амплитуде ТЭГ/ТЭМ.

A — амплитуда ТЭГ/ТЭМ через 10, 15, 20, 30 минут (A10, A15, A20, A30, соответственно).

MCE/G (maximum clot elasticity) — максимальная эластичность сгустка. Вычисляется по формуле:

$$MCE = 100 \times MCF / (100 - A).$$

LY/CL (lysis index/clot lysis) — литический индекс. Индекс представляет собой отношение амплитуды сгустка в данный момент времени к максимальной амплитуде сгустка и выражается в процентах.

ML (maximum lysis) — максимальный лизис. Параметр представляет собой разницу между максимальной амплитудой и наименьшей амплитудой, полученной после достижения максимума ТЭГ/ТЭМ.

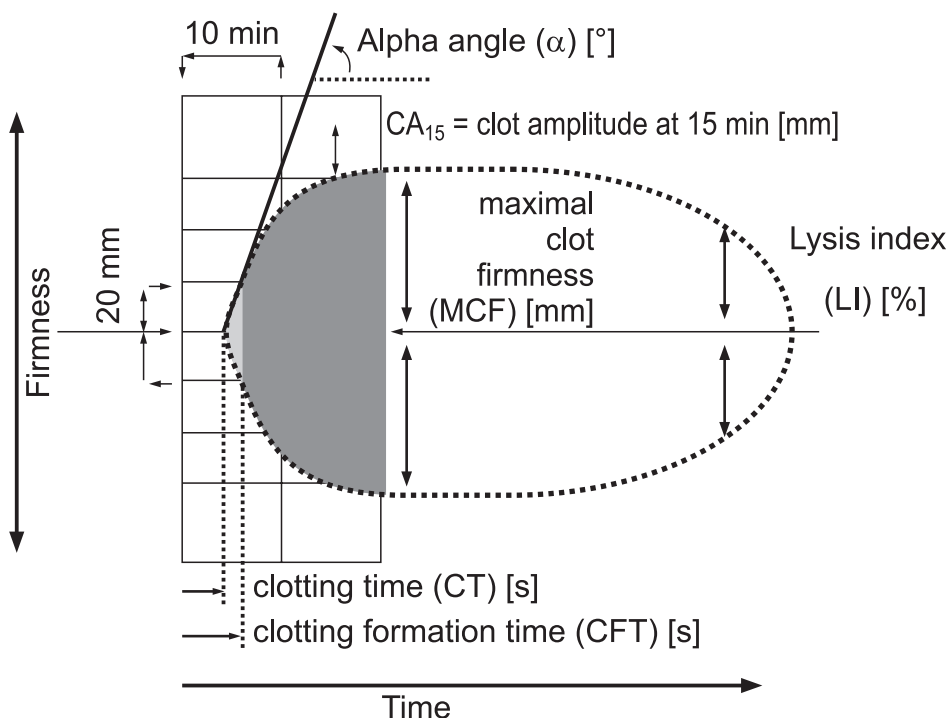


Рис. 1. Графическое изображение и пример расчета основных показателей темограммы (пояснение к рисунку в тексте)

Основное использование метод ТЭГ/ТЭМ нашел в urgentных ситуациях, для диагностики стремительно развивающихся нарушений системы гемостаза при крупных хирургических операциях, сопровождающихся массивной кровопотерей: трансплантация печени, сердечно-сосудистая хирургия, травматология, нейрохирургия, акушерская патология. ТЭГ/ТЭМ является дополнительным методом контроля за антикоагулянтной и антиагрегантной терапией.

Впервые ТЭГ/ТЭМ в современной медицине были применены с целью контроля системы гемостаза при трансплантации печени. Кровотечение — частое осложнение, возникающее во время и после трансплантации печени и являющееся причиной высокой летальности. Послеоперационное кровотечение развивается вследствие разнообразных причин: количественные и качественные дефекты факторов свертывания, антикоагулянтов, тромбоцитов, а также как результат повышенной активности фибринолитической системы. Кроме того, причиной коагулопатии могут быть системные осложнения, такие как сепсис и диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС) [2]. Самое распространенное нарушение в системе гемостаза — гиперфибринолиз, что может быть связано с повышением уровня тканевого активатора плазминогена (tPA), высвобождающегося из эндотелия при удалении печени и после реваскуляризации пересаженного органа, и снижением содержания альфа-2-антиплазмина, основного физиологи-

ческого ингибитора плазмина [3]. Гиперфибринолиз визуализируется на тромбоэластограмме и выражается уменьшением МА [4].

Фармакотерапия, применяемая с целью снижения кровопотери при трансплантации печени, направлена на подавление фибринолиза, нейтрализацию гепарина или использование препаратов с прокоагулянтной активностью.

Нарушение в системе гемостаза также может быть вызвано действием гепарина и гепариноидов, используемых при трансплантации печени. Влияние гепарина было продемонстрировано многими исследователями в тесте ТЭГ с использованием гепариназы [5, 6, 7].

Переливание цельной крови или ее продуктов (тромбоциты, свежемороженая плазма, криопреципитат) — частое явление во время хирургического вмешательства, которое осуществляется под контролем стандартных лабораторных тестов (количество тромбоцитов, уровень фибриногена, протромбиновое время, активизированное парциальное тромбопластиновое время). В 1985 г. Kang Y., Marquez D. и другими исследователями был использован метод ТЭГ для выбора препарата и оценки эффективности кровезамещающей терапии. В частности, увеличение времени образования сгустка (r) было показанием к использованию свежемороженой плазмы, снижение максимальной амплитуды (МА) — к применению тромбоцитарной массы, уменьшение угла α — показание к применению криопреци-

питата. Было продемонстрировано, что использование ТЭГ значительно сократило (на 33%) объемы цельной крови для кровезамещения [8]. Однако отсутствие четких и ясных руководств не позволяет использовать предложенный алгоритм кровезамещающей терапии на данном этапе развития метода. Работа в этом направлении продолжается.

Многими авторами было продемонстрировано использование ТЭГ во время трансплантации печени и для контроля терапии препаратами, влияющими на систему гемостаза: аминокарпоновая кислота [9], апротинин [10], десмопрессин [11], транексамовая кислота [12, 13], эстрогены [14].

У кардиохирургических больных среди послеоперационных осложнений лидирующее положение занимает повышенная кровопотеря. К факторам риска послеоперационного кровотечения относят: неадекватный хирургический гемостаз, искусственное кровообращение (ИК) в условиях гипотермии без применения апротинина, длительное время ИК, неадекватная нейтрализация гепарина протамин сульфатом, развитие «рикошетного эффекта» гепарина в раннем послеоперационном периоде, применение антитромботических и антифибринолитических препаратов на дооперационном этапе, развитие ДВС-синдрома [15].

Основным пусковым механизмом активации фибринолиза является контакт с чужеродной поверхностью, что наиболее существенно при операциях с ИК. В результате этого контакта образуются фактор XIIa и калликреин, которые трансформируют плазминоген в плазмин. При действии плазмينا на фибриноген и фибрин формируются продукты деградации фибриногена/фибрина (ПДФ), которые оказывают действие на все звенья гемостаза. ПДФ вызывают нарушение микроциркуляции, нарушение образования фибрина, дисфункцию тромбоцитов. Кроме этого, активация фибринолиза в условиях ИК может быть связана с высвобождением профибринолитиков вследствие значительной хирургической травмы и метаболических нарушений в отдельных органах.

Wahba A. и соавт. [16] выявили наличие достоверной корреляции между продолжительностью ИК и снижением числа и функции тромбоцитов. На тромбоцитарную депрессию также оказывает влияние степень гипотермии [17]. Эффект гипотермии был изучен S. Kettner и соавт. в 1998 г. При анализе на ТЭГ они наблюдали гипокоагуляцию со снижением параметров, характеризующих время и скорость образования фибрина (r-time, k, угол α) [18].

Несмотря на оптимистические сообщения многих авторов, в литературе встречаются противоречивые данные об использовании метода ТЭГ/ТЭМ с целью прогнозирования риска кровотечения и контроля гемостатической терапии в кардиохирургии.

По результатам исследований, проведенных В. Н. Dorman с соавт., которые обследовали пациентов до, после

и во время операции с ИК, было установлено, что параметры ТЭГ не в состоянии выявить риск интраоперационной кровопотери [19].

Другие авторы утверждают, что использование ТЭГ снижает риск кровотечения, объемы кровезамещающей терапии и уровень смертности. Так, Spiess B.D. с соавт. исследовали 38 пациентов после оперативного вмешательства на сердце и установили снижение частоты эпизодов кровотечения с 5,7% до 1,5% [20].

Tuman K.T. и Essell J.H. выявили, что у пациентов с патологической ТЭГ отмечалась более значительная послеоперационная кровопотеря, чем у пациентов с нормальной ТЭГ. Авторами также был сделан вывод, что ТЭГ имеет высокую значимость для предотвращения повторного кровотечения [21, 22].

В результате рандомизированного проспективного исследования значимости применения ТЭГ для контроля за плазмозамещающей терапией при операциях с ИК было выявлено снижение объема гемотрансфузии в ходе операции и в послеоперационном периоде, а также снижение на 75% количества пациентов, получающих свежезамороженную плазму, и на 50% количества пациентов, получающих тромбоцитарную массу [23].

Многие исследователи пришли к выводу, что использование ТЭГ вместе с другими лабораторными методами исследования системы гемостаза, например, PFA-100, позволяет получить результаты с высокой прогностической значимостью [24, 25].

За пределами кардиальной хирургии и трансплантации печени применение ТЭГ/ТЭМ встречается редко. С. Kaufmann с коллегами в 1997 г. обследовали 69 пациентов с тупой травмой и пришли к выводу, что только ТЭГ способна выявить ранние показания к гемотрансфузии, а также пациентов с гиперкоагуляцией [26].

По результатам проведенного проспективного исследования больных после оперативного вмешательства на органах брюшной полости была выявлена высокая прогностическая значимость дооперационной ТЭГ для определения риска послеоперационных тромбозов. Так, для пациентов с тромбозом глубоких вен (ТГВ) в раннем послеоперационном периоде было характерно увеличение максимальной амплитуды ТЭГ. Чувствительность метода составила 72,2%, специфичность — 69 % [27].

J. O'Donnell с группой исследователей показал, что ТЭГ — более чувствительный метод, чем обычные лабораторные тесты для диагностики венозного тромбоэмболизма (ВТЭ). По результатам стандартных исследований пациентов с ВТЭ тромбофилические нарушения были выявлены у 34% пациентов, в то время как на ТЭГ определялись в 45% исследований [28].

В литературе встречаются немногочисленные данные об использовании ТЭГ для диагностики и контроля терапии наследственных гемофилий. N. Kucher в своем исследовании выявил снижение максимальной твердости сгустка у пациентов с дефицитом фактора VIII [29].

Некоторыми исследователями опубликованы сведения о применении ТЭГ для контроля эффективности терапии прямыми антикоагулянтами [30, 31].

Ряд ученых, изучая эффекты различных антиагрегантов с помощью ТЭГ/ТЭМ — аспирина [32, 33, 34], антагонистов GР IIb/IIIa [35, 36], простациклина [37], — не получил положительного результата.

Первая попытка сравнить ТЭГ с результатами стандартных лабораторных тестов была предпринята Zuskerman L. в 1981 г. По результатам этого исследования была установлена взаимосвязь максимальной амплитуды ТЭГ с количеством тромбоцитов и концентрацией фибриногена [38]. Этот же результат был подтвержден Orlikowski С.Е.Р. [39]. Другие исследователи отвергают корреляционную связь с этими показателями [40, 41]. Несопоставимость полученных результатов можно объяснить небольшой выборкой исследования, различной чувствительностью оборудования и реагентов [42].

К.Ј. Tuman сравнивал ТЭГ с оценкой функциональной активности тромбоцитов с использованием аденозиндифосфата (АДФ) и коллагена. Результатом исследования стала положительная корреляционная связь между углом α , максимальной амплитудой, амплитудой через 60 минут ТЭГ и ответом тромбоцитов на индукторы [43].

В то же время S.E. McNulty с соавт. по результатам исследований пришли к выводу, что ТЭГ не является надежным методом для оценки функции тромбоцитов. Они сравнивали показатели ТЭГ в пробах крови до и после разрушения тромбоцитов и не выявили значимых различий [44].

Важной проблемой лабораторной диагностики является выработка референтных интервалов, особенно для исследования свертывающей системы крови. Эта необходимость обусловлена многими причинами: различиями в составе реагентов, способах очистки, разных методах детекции и использованием различного оборудования. Поэтому многие производители рекомендуют выработку референтных интервалов внутри лаборатории. В связи с этим нами были исследованы показатели ТЭМ у 57 условно здоровых лиц, из них 42 мужчины и 15 женщин, средний возраст которых составил $49,8 \pm 4,0$. Выбор данной возрастной группы объясняется дальнейшими нашими исследованиями, направленными на изучение параметров системы гемостаза у лиц именно этого возраста.

Обследованные лица не имели заболеваний, связанных с нарушением в системе гемостаза. Всем им были выполнены стандартная коагулограмма (протромбиновое время, активированное парциальное тромбопластиновое время, тромбиновое время, концентрация фибриногена, агрегационная способность тромбоцитов, количество тромбоцитов, уровень D-димера), биохимические исследования (общий белок, креатинин, мочевины, липидный спектр, трансаминазы, билирубин) и клинический анализ крови. Отклонения от референтных

значений являлись критериями исключения из исследования.

В исследование не вошли лица, перенесшие за последний год хирургическое вмешательство, переливание крови, принимающие лекарственные препараты, имеющие хронические заболевания, беременные и кормящие грудью.

Тромбоэластометрия выполнялась на 30 приборе «Rotem» с использованием диплосистем, реагентов и контрольных материалов, предлагаемых производителем оборудования («Pentapharm GmbH», Германия). Для анализа ТЭМ забор крови проводился натошак из локтевой вены с помощью системы «Vacuette» в пробирки, содержащие 3,2% цитрата натрия в соотношении 1:9. При этом были соблюдены преаналитические условия для данного вида исследования.

Нами были проведены следующие виды тестов:

- I. Natem тест. Для проведения теста был использован Natem реагент, в состав которого входит хлорид кальция.
- II. Extem тест (оценка параметров свертывания внешнего пути). Для активации коагуляции использовали реагент, одним из компонентов которого является тромбопластин.
- III. Intem тест (оценка параметров свертывания внутреннего пути). Реакция коагуляции запускается элаговой кислотой, входящей в состав основного реагента.
- IV. Fibtem тест (оценка фибринообразования без участия тромбоцитов). Для проведения теста с целью ингибирования тромбоцитов используется реагент, включающий в себя цитохалазин D.

Исследование для Natem теста было начато в течение получаса после забора крови, а для остальных видов тестов в пределах двух часов. До момента анализа пробы крови хранились при комнатной температуре. Тесты были выполнены в соответствии с программой автоматического пипетирования, предложенной производителем.

Полученные нами данные представлены в таблице 2. За референтные интервалы принято отклонение от среднего значения исследуемой величины в два стандартных отклонения (табл. 3).

При сравнении полученных данных с референтными значениями, рекомендуемыми производителем, было отмечено сужение референтных интервалов по всем показателям ТЭМ, за исключением показателя ML в Extem тесте (92–100% — результат, полученный нами и 94–100% — значение, указанное производителем). Существенное отклонение от референтных значений, предложенных производителем, получено нами только для угла альфа в тесте Natem (33–59° — результат, полученный нами и 70–300° — значение, указанное производителем).

Дополнительно нами были рассчитаны референтные интервалы для следующих показателей: амплитуда через

Таблица 2

Показатели ТЭМ (“Rotem”), полученные при исследовании условно здоровой группы (n = 57)

Показатели ТЭМ	Natem			Extem			Intem			Fibtem		
	X	мин.– макс.	S	X	мин.– макс.	S	X	мин.– макс.	сиг- ма	X	мин.– макс.	S
CT, с	746,7	441–925	92,1	59,4	49–77	7,1	170,7	59–223	22,4	57,8	43–79	8,9
A5, мм	22,5	13–38	5,0	45,6	33–54	5,45	46,4	36–54	4,2	13,3	7–19	2,9
A10, мм	36,2	28–50	5,0	55,2	44–63	5,1	55,8	46–63	4,0	14,4	8–20	3,1
A15, мм	43,4	35–55	4,8	59,2	48–68	4,7	59,7	51–66	3,8	14,8	9–20	2,7
A30, мм	50,5	44–60	4,4	61,2	51–69	4,2	61,8	52–68	3,7	15,4	10–21	2,8
MCF, с	51,2	44–60	4,4	61,5	51–69	4,21	62,3	52–68	3,6	15,5	9–21	3,0
угол α , °	45,9	34–65	6,6	73,4	64–79	3,5	76,7	71–80	2,16	69,4	57–78	5,5
LY45, %	–	–	–	96,7	93–100	2,1	96,5	92–100	1,92	99,6	97–100	0,85
ML, %	–	–	–	9,4	5–17	3,6	9,3	5–15	2,83	–	–	–
MCE	103,6	62–153	23,9	161	105–214	27	160	109–216	24	17,2	9–26	5,6
AR5, мм ²	117,9	71–220	29,4	294	200–365	41	304	227–371	33,6	113	71–158	23,2
AR10, мм ²	418	259–669	80,3	807	595–951	94,7	814	649–961	74,4	254	155–352	51,4
AR15, мм ²	822	628–1196	124	–	1059–1606	141	1386	1143–1608	113	399	244–551	77,9

Таблица 3

Референтные интервалы ТЭМ, полученные при исследовании условно здоровой группы (n = 57)

Показатели ТЭМ	Natem	Extem	Intem	Fibtem
CT, с	562–931	45–73	125–215	40–75
A5, мм	12–32	34–56	38–55	7–19
A10, мм	26–46	44–65	48–64	8–21
A15, мм	34–53	49–68	52–67	9–20
A20, мм	38–56	52–69	54–69	9–21
A25, мм	40–58	53–70	55–69	9–21
A30, мм	42–59	53–70	54–69	9–21
CFT, с	152–386	44–118	40–94	–
MCF, мм	42–60	53–70	55–69	9–22
угол α , °	33–59	66–80	72–81	58–81
LY45, %	–	92–100	93–100	97–100
ML, %	–	2–17	4–15	–
MCE	65–147	107–215	112–208	6–29
AR5, мм ²	59–177	212–377	236–371	67–159
AR10, мм ²	257–579	617–997	665–963	151–357
AR15, мм ²	573–1072	1102–1665	1159–1613	244–555

5, 10, 15, 30 минут (А), эластичность сгустка (МСЕ), площадь темограммы через 5, 10, 15 минут (AR) с целью более детального изучения процесса свертывания в первые минуты образования сгустка.

Выводы

Таким образом, при анализе литературы мы убедились, что метод ТЭМ успешно используется во всем мире. Учеными многих стран подчеркивается высокая эффективность метода для оценки параметров системы гемостаза. Наибольшие успехи достигнуты в кардиальной хирургии и трансплантации печени. Результаты исследований свидетельствуют о снижении риска кровотечения, послеоперационных тромбозов и смертности. Активно предпринимаются попытки использования ТЭМ за пределами кардиальной хирургии и трансплантации печени. Важное место в развитии ТЭМ занимает работа, направленная на стандартизацию метода и выработку референтных интервалов. Результаты нашего исследования подтверждают необходимость выработки референтных интервалов внутри каждой конкретной лаборатории.

Литература

- Lang T., Ramschak H., Lakner M., Toller W., Gütl M., Mahla E. et al. Evaluation the FIBTEG-S reagent on the ROTEG [abstract]// Haemostaseologie. — 2004. — N 24.
- Spiel A.O. Validation of rotation thrombelastography in a model of systemic activation of fibrinolysis and coagulation in humans// J. Thromb. Haemost. — 2006. — N 4. — P. 411–416.
- Porte R.J., Bontempo F.A., Knot E.A., Lewis J.H., Kang Y.G., Starzl T.E. Systemic effects of tissue plasminogen activator-associated fibrinolysis and its relation to thrombin generation in orthotopic liver transplantation// Transplantation. — 1989. — N 47. — P. 978–984.
- Salooja N., Perry David J. Thrombelastography// Blood Coagul Fibrinolysis. — 2001. — N 12. — P. 327–337.
- Pivalizza E. Heparinase and thrombelastography in liver transplantation for a patient with von Willebrand's disease// Anesthesiology. — 1996. — N 84. — P. 1236–1239.
- Harding S.A., Mallett S.V., Peachey T.D., Cox D.J. Use of heparinase modified thrombelastography in liver transplantation// Br. J. Anaesth. — 1997. — N 78. — P. 175–179.
- Kettner S., Gonano C., Seebach F., Sitzwohl C., Acimovic S., Stark J., Schellongowski A., Baicher A., Felfernig M., Zimpfer M. Endogenous heparin-like substances significantly impair coagulation in patients undergoing orthotopic liver transplantation// Anesthesia and Analgesia. — 1998. — N 86. — P. 691–695.
- Kang Y., Marquez D., Lewis J., Bontempo F., Shaw B., Starzl T., Winter P. Intraoperative changes in blood coagulation and thrombelastographic monitoring in liver transplantation// Anesthesia and Analgesia. — 1985. — N 64. — P. 888–896.
- McSorelty M.W., Taraporewalla K.J. Does prophylactic epsilon aminocaproic acid improve blood loss and coagulation in liver transplantation// Transplant Proc. — 1991. — N 23.
- Kang Y., De Wolf A.M., Aggarwal S., Campbell E., Martin L.K. In vitro study of the effects of aprotinin on coagulation during orthotopic liver transplantation// Transplantation Proc. — 1991. — N 23. — P. 1934–1935.
- Csete M., Mason T., Neelakanta G., Floegel C., Calhoun K. Desmopressin Acetate (DDAVP) is not effective in treating coagulopathy during liver transplantation (Abstract)// Anesthesiology. — 1993. — N 79. — P. 47–52.
- Kaspar M., Ransay M., Nguyen A-T., Cogswell M., Hurst G., Ramsay K.J. Continuous small-dose tranexamic acid reduces fibrinolysis but not transfusion requirements during orthotopic liver transplantation// Anesth. Analg. — 1997. — N 85. — P. 281–285.
- Boylan J.F., Klinck J.R., Sandler A.N. Tranexamic acid reduces blood product loss, transfusion requirements and coagulation factor use in primary orthotopic liver transplantation// Anesthesiology. — 1996. — N 85. — P. 1043–1048.
- Frenette L., Cox J., McArdle P., Eckhoff D., Bynon S. Conjugated estrogen reduces transfusion and coagulation factor requirements in orthotopic liver transplantation// Anesth. Analg. — 1998. — N 86. — P. 1183–1186.
- Gravlee G., Haddon W., Rothberger H., Mills S., Rogers A., Bean V., Buss D., Prough D., Cordell A. Heparin dosing and monitoring for cardiopulmonary bypass. A comparison of techniques with measurement of subclinical plasma coagulation// Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. — 1990. — N 99. — P. 518–527.
- Wahba A., Rothe G., Lodes H. et al. Hematologic changes during and after cardiopulmonary bypass and their relationship to the bleeding time and nonsurgical blood loss// J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 1992. — N 104. — P. 153–156.
- Чарная М.А., Морозов Ю.А., Гладышева В.Г. и др. Нарушение тромбоцитарного звена гемостаза как причина повышенной кровопотери после операции на сердце в условиях искусственного кровообращения// Тромбоз, гемостаз и реология. — 2003. — N 1. — С. 66–69.
- Kettner S., Kozek S., Groetzner J., Gonano C., Schellongowski A., Kucera M., Kimpfer M. Effects of hypothermia on thrombelastography in patients undergoing cardiopulmonary bypass// British Journal of Anaesthesia. — 1998. — N 80. — P. 313–317.
- Dorman B.H., Spinale F.G., Bailey M.K., Kratz J.M., Raymond C.R. Identification of patients at risk for excessive blood loss during coronary artery bypass surgery: thrombelastograph versus coagulation screen// Anesth. Analg. — 1993. — N 76. — P. 694–700.
- Spiess B.D., Gillies B.S.A., Chandler W., Verrier E. Changes in transfusion therapy and re-exploration rate after institution of a blood management program in cardiac surgical patients// J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. — 1995. — N 9. — P. 168–173.
- Tuman K.T., Spiess B.D., McCarthy R.J., Ivankovich A.D. Comparison of viscoelastic measures of coagulation after cardiopulmonary bypass// Anesth. Analg. — 1989. — N 69. — P. 69–75.
- Essell J.H., Martin T.J., Salinas J., Thompson J.M., Smith V.C. Comparison of thrombelastography to bleeding time and standard coagulation tests in patients after cardiopulmonary bypass// J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. — 1993. — N 7. — P. 410–415.
- Shore Lesserson L., Manspeizer, DePerio M., Francis S., Vela Cantos F., Ergin A. Thrombelastography guided transfusion algorithm reduces transfusions in complex cardiac surgery// Anesth. Analg. — 1999. — N 88. — P. 312–319.
- Cammerer U., Dietrich W., Rampf T., Braun S., Richter J. The predictive value of modified computerized thrombelastography and platelet function analysis for postoperative blood loss in routine cardiac surgery// Anesthesia and Analgesia. — 2003. — N 96. — P. 51–57.
- Avidan M., Alcock E., DaFonsecca J. et al. Comparison of structured use of routine laboratory tests or near-patient assessment with clinical judgement in the management of bleeding after cardiac surgery// British Journal of Anaesthesia. — 2004. — N 92. — P. 178–186.

26. Kaufmann C., Dwyer K., Crews J., Dols S., Trask A. Usefulness of thrombelastography in assessment of trauma patients coagulation// *Journal of Trauma*. — 1997. — N 4. — P. 716–720.
27. Traverso C.L., Arcelus J.I., Gomez E., Luna D., Lopez-Cantarero M., Garcia J.M. Prospective assessment of the risk of deep vein thrombosis in elective abdominal surgery. Predictive role of thrombelastography// *Thromb. Haemorrh Disorders*. — 1993. — N 71. — P. 9–15.
28. O'Donnell J., Riddell A., Owens D., Handa A., Pasi J., Hamilton G., Perry D. Role of the thrombelastograph as an adjunctive test in thrombophilia screening// *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. — 2004. — N 15. — P. 207–211.
29. Kucher N., Schroeder V., Kohler H. Role of blood coagulation factor XIII in patients with acute pulmonary embolism. correlation of factor XIII antigen levels with pulmonary occlusion rate, fibrinogen, D-dimer and clot firmness// *Thrombosis and Haemostasis*. — 2003. — N 90. — P. 434–438.
30. Klein S., Slaughter T., Vail P., Ginsberg B., El-Moalem H., Alexander R., D'Ercole F., Greengrass R., Perumal T., Welsby I., Gan T. Thromboelastography as a perioperative measure of anticoagulation resulting from low molecular weight heparin: a comparison with anti-Xa concentrations// *Anesthesia and Analgesia*. — 2000. — N 91. — P. 1091–1095.
31. Zmuda K., Neofotistos D., Ts'ao C. Effects of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, heparinoid on thromboelastographic assay of blood coagulation// *American Journal of Clinical Pathology*. — 2000. — N 113. — P. 725–731.
32. Mallet S.V., Platt M. Role of thrombelastography in bleeding diatheses and regional anaesthesia// *Lancet*. — 1991. — N 338. — P. 765–766.
33. Orlikowski C.E.P., Moodley J., Rocke D.A. Thrombelastography in pregnant patients on low-dose aspirin// *Lancet*. — 1991. — N 338. — P. 1276–1277.
34. Trentalange M., Walts L. A comparison of thromboelastogram and template bleeding time for the evaluation of platelet function after aspirin ingestion// *Journal of Clinical Anesthesia*. — 1991. — N 3. — P. 377–381.
35. Khurana S., Mattson J., Westley S., O'Neill W., Timmis G., Safian R. Monitoring platelet glycoprotein IIb/IIIa fibrin interaction with tissue factor-activated thromboelastography// *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. — 1997. — N 130. — P. 401–411.
36. Mousa S., Forsythe M. Comparison of the effect of different platelet GPIIb/IIIa antagonists on the dynamic of platelet/fibrin-mediated clot strength induced using thromboelastography// *Thrombosis Research*. — 2001. — N 104. — P. 49–56.
37. van Heerden P., Gibbs N., Michalopoulos N. Effect of low concentrations of prostacyclin on platelet function in vitro// *Anaesthesia Intensive Care*. — 1997. — N 25. — P. 343–346.
38. Zuckerman L., Cohen E., Vaughan J., Woodward E., Caprini J. Comparison of thrombelastography with common coagulation tests// *Thrombosis and Haemostasis*. — 1981. — N 46. — P. 752–756.
39. Orlikowski C.E.P., Rocke D.A., Murray W.B., Gouws E., Moodley J., Kenoyer D.G., Byrne S. Thrombelastography changes in pre-eclampsia and eclampsia// *Br. J. Anaesth*. — 1996. — N 77. — P. 157–161.
40. Oshita K., Toshiharu A-M., Osawa Y., Yuge O. Quantitative measurement of thrombelastography as a function of platelet count// *Anesth. Analg*. — 1999. — N 89. — P. 296–299.
41. Ben Ari Z., Panagou M., Patch D., Bates S., Osman E., Pasi J., Burroughs A. Hypercoagulability in patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis evaluated by thrombelastography// *Hepatology*. — 1997. — N 26. — P. 554–559.
42. Etzioni D.A., Tobias M.D., Jobes D.R. Thrombelastography results are easily affected by sample and technique// *Anaesth. Analg*. — 1995. — N 80. — P. 133–140.
43. Tuman K.J., McCarthy R.J., Patel R.V., Patel R.B., Ivankovich A.D. Comparison thrombelastography and platelet aggregation// *Anesthesiology*. — 1991. — N 75. — P. 433–444.
44. McNulty S.E., Sasso D.O., Vesci J., Schieren H. Platelet concentrate effects on thrombelastography// *J. Cardiothoracic Vasc. Anesth*. — 1997. — N 11. — P. 828–830.

НЕИНВАЗИВНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ: ДО СВИДАНЬЯ, БИОПСИЯ?

В.В. ВЕЛЬКОВ
ЗАО «ДИАКОН»

Резюме. Обзор научной литературы, касающийся проблем неинвазивной диагностики фиброза печени. Кратко рассматриваются биохимические механизмы развития фиброза, прямые и не прямые маркеры фиброза и наиболее оптимальные их сочетания, позволяющие диагностировать как стадии фиброза, так и его воспалительную активность.

Ключевые слова: обзор литературы, цирроз печени, биохимические маркеры, прогноз.

NONINVASIVE BIOMARKERS OF LIVER FIBROSIS: GOOD BY, BIOPSY?

V.V. VELKOV
DIAKON, Ltd

Summary. Review of scientific literature concerning the problems of noninvasive diagnostics of liver fibrosis including short review of the mechanisms of fibrosis development, the direct and indirect markers of fibrosis and their optimal combinations providing diagnostics of fibrosis stages and their inflammatory activity.

Key words: review, liver cirrhosis, biochemical markers, prognosis.

Цирроз и рак печени входят в первую десятку причин смертности во всем мире, а во многих развивающихся странах патологии печени входят в первую пятерку причин смертности [1]. Диагностика и мониторинг динамики хронических заболеваний печени — одна из самых актуальных задач современной гепатологии.

Стадии развития фиброза печени и их биомаркеры

Фиброз — это накопление в печени жесткой волокнистой (рубцовой) ткани, состоящей преимущественно из коллагена. Основной путь прогрессирования хронических диффузных заболеваний печени — развитие последовательных стадий фиброза с формированием цирроза и рака печени, что предопределяет плохой прогноз и короткие сроки выживаемости больных. Количественные показатели тяжести фиброза — это достоверный индикатор прогрессирования патологий печени, их определение прогностически значимо и используется как один из важнейших параметров для выработки объективного подхода к схеме лечения и к его мониторингу.

Механизм развития фиброза печени — избыточный синтез клеточного матрикса. Ранние стадии фиброза диагностировать трудно. Начинается фиброз в печени и в других органах системы воротной вены и развивается в следующей последовательности: значительно увеличивается селезенка, появляются варикоз вен пищевода и кровотечения из них. Возникают: анемия, лейкопения, тромбоцитопения. Фиброз прогрессирует медленно: симптомы проявляются через 6–8 лет после начала заболевания. При этом явные симптомы цирроза печени отсутствуют. На клеточном уровне фиброз начинается с

повреждения функции гепатоцитов. Когда функции гепатоцитов нарушаются, это: 1) активирует иммунную систему. Затем 2) повреждение или некроз гепатоцитов «заставляет» возбужденные иммунные клетки патологически вырабатывать повышенные количества цитокинов, факторов роста и др. соединений. После этого 3) избыточное количество цитокинов в свою очередь стимулирует избыточное образование соединительной ткани, в частности 4) цитокины и факторы роста активируют *стеллатные* (звездчатые) клетки печени и 5) стимулируют в них синтез коллагена, ламинина, фибронектина, гликозамингликанов, протеогликанов, эластина и др. белков соединительной ткани. 6) Накопление коллагена и др. белков вызывает в печени разрастание нефункциональной соединительной ткани. К тому же замедляется процесс деградации коллагена, что нарушает равновесие между фиброгенезом (синтезом соединительной ткани) и фибролизом (распадом ткани соединительнотканного матрикса) — коллагеновая рубцовая ткань разрастается быстрее, чем разрушается и выводится из печени, наступает фиброз. Процесс деградации коллагена замедляется. В норме в печени синтез (фиброгенез) и распад (фибролиз) матриксной ткани находятся в равновесии. Но если избыточная коллагеновая рубцовая ткань разрастается быстрее, чем разрушается и выводится из печени, наступает фиброз.

Основной тип гепатоцитов, продуцирующих клеточный матрикс, — это гепатические стеллатные (звездчатые) клетки (Hepatic Stellate Cells — HSC). В норме эти клетки находятся в покоящемся состоянии и играют роль хранилища витамина А. Но когда они активируются, то приобретают фенотип миофибробластов, способ-

ных синтезировать коллаген и др. белки, характерные для соединительных тканей. Такие образовавшиеся фиброзные ткани в этом случае подвергаются ремоделированию за счет расщепления матрикса с помощью *матриксных металлопротеиназ* (matrix metallopeptinases — MMPs).

В свою очередь расщепление матрикса регулируется ингибированием MMPs с помощью *тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ* (TIMPs), основную роль в этом процессе играет TIMP-1. Если раньше фиброз понимался как накопление в печени рубцов, то сейчас он представляется как динамический процесс, который может прогрессировать или регрессировать в течение месяцев [2]. Затем может наступить цирроз печени — хроническое заболевание, характеризующееся: 1) дистрофией печеночных клеток, 2) процессом замещения нормальной ткани печени рубцовой тканью, приобретающей форму узлов. Узлы сдавливают: 1) кровеносные сосуды, 2) желчные протоки и 3) нормальную печеночную ткань. Накопление внеклеточной ткани вокруг гепатоцита в районе центральной вены препятствует движению крови по синусоидным капиллярам [3].

Биопсия — «золотой стандарт» диагностики фиброза печени

Количественные показатели тяжести и скорости прогрессирования фиброза — важнейший клинический параметр, определение которого имеет решающее значение для правильной диагностики фиброза, для выбора правильной терапии и для мониторинга ее эффективности. Золотой стандарт диагностики фиброза — биопсия печени. Однако с ее широким применением, вызванным эпидемическим ростом заболеваемости фиброзом и циррозом, связаны тяжелые, можно сказать, «свинцовые» проблемы. Это: 1) отсутствие нормативных документов, регламентирующих проведение данной манипуляции; 2) значительные различия результатов в различных образцах, полученных из одного органа: при определении стадии фиброза такие различия могут достигать 40%; 3) высокая внутри- и межпатологическая вариабельность результатов; 4) нехватка квалифицированных специалистов, способных объективно описать и дать количественную оценку гистологическим признакам; 5) инвазивный характер процедуры с потенциальным риском развития осложнений, которые напрямую связаны с опытом врача, выполняющего биопсию; 6) частые отказы пациентов от биопсии из-за страха перед ее проведением: боль в месте прокола и побочные эффекты анестезии заставляют до 1/3 больных избегать биопсии, что приводит к замедлению принятия решения о начале противовирусной терапии и о продлении сроков госпитализации; 7) возможные осложнения — от незначительных (около 30% пациентов испытывают боль) до более тяжелых (включая смертность примерно в 0,03% случаев) [4–6].

Классификация (градация) степеней тяжести фиброза

Общепринятыми являются три основные и стандартизированные системы градации фиброза печени: 1) *METAVIR*, 2) Индекс гистологической активности (ИГА) согласно Knodell и 3) Модифицированный индекс гистологической активности по Ицхаку (*Ishak*). Эти системы основаны на результатах биопсии печени. Наиболее применяемые системы *METAVIR*, Knodell и *Ishak* (табл. 1) [7–12].

Можно ли оценивать прогрессирование тяжести фиброза печени согласно этим показателям не с помощью биопсии, а неинвазивно, за счет измерения сыровоточных уровней подходящих биомаркеров? Похоже, что да. И большое количество таких неинвазивных тестов основано на том, что *результаты измерения уровней соответствующих биомаркеров с помощью специально разработанных алгоритмов сразу преобразуются в показатели тяжести фиброза, чаще всего в показатели систем METAVIR и Ishak, которые отражают как стадии прогрессирования фиброза, так и активность некро-воспалительного процесса в печени.*

Однако некоторые авторы предлагают собственные системы индексов и алгоритмы их вычисления, либо количественно оценивающие тяжесть фиброза, либо свидетельствующие о нем на качественном уровне: есть или нет. При этом предлагаются пограничные уровни таких индексов, сопоставляемые с конкретными значениями международных систем оценки фиброза.

Два класса маркеров фиброза

1. Прямые. Маркеры, характеризующие: а) метаболизм в клеточном матриксе (фиброгенез и фибролиз) и/или, б) изменения в стеллатных клетках, которые доминируют в профиброзных клетках. Такие *прямые биомаркеры фиброза* — это фрагменты клеточного матрикса печени, образованные стеллатными клетками, и молекулы, участвующие в регуляции прогрессии и регрессии фиброза. Это: *гиалуриновая кислота (ГК), коллагены IV и VI, аминотерминальный фрагмент проколлагена III (P3NP), матриксные металлопротеиназы и TIMP-1 — тканевой ингибитор металлопротеиназы 1.*

2. Непрямые. Это традиционные сыровоточные маркеры, характеризующие изменение функции печени и *необязательно отражающие изменения в клеточном матриксе или в профиброзных клетках.* *Непрямые маркеры фиброза* — это молекулы, высвобождаемые в кровь из-за патологического процесса, идущего в печени. В частности, это: 1) *аминотрансферазы АЛТ и АСТ*, 2) молекулы, синтезируемые, регулируемые или секретируемые печенью, например, *аполипопротеин А1, альфа-2-макроглобулин (А2М), ферритин, гаптоглобин*, 3) *факторы свертывания*, 4) *холестерин и билирубин*, а также 5) маркеры патологий, которые возникают при повреждении функции печени.

Таблица 1

Сравнительная характеристика систем полуколичественной оценки фиброза печени

Баллы	R.G. Knodell, 1981	P.J. Scheuer, 1991	K.G. Ishak, 1994	K.P. Batts, 1995	METAVIR, 1994
0	Фиброз отсутствует	Фиброз отсутствует	Фиброз отсутствует	Фиброз отсутствует	Фиброз отсутствует
1	Фиброзное расширение портальных трактов	Расширенные фиброзные портальные тракты	Фиброзное расширение портальных трактов с или без коротких фиброзных септ	—	Звездчатое расширение портальных трактов без образования септ
2	Расширение портальных трактов + портопортальные септы	Перипортальные и портопортальные септы, строение печени не нарушено	Фиброзное расширение большинства портальных трактов с или без коротких фиброзных септ	Портальный фиброз	Расширение портальных трактов с единичными портопортальными септами
3	Мостовидный фиброз — портопортальные или портоцентральные септы	Фиброз с нарушением строения печени, но без явного цирроза	Фиброзное расширение большинства портальных трактов с единичными мостовидными портопортальными септами	Перипортальный фиброз, септальный фиброз	Многочисленные портоцентральные септы без цирроза
4	Цирроз	Вероятный или несомненный цирроз	Фиброзное расширение портальных трактов с выраженными мостовидными портопортальными и портоцентральными септами	Цирроз	Цирроз
5	—	—	Многочисленные мостовидные септы с единичными узелками (неполный цирроз)	—	—
6	—	—	Цирроз, вероятный или достоверный	—	—

Непрямые маркеры фиброза

Аланинаминотрансфераза (АЛТ). Наиболее чувствительный и специфичный индикатор гепатоцеллюлярного повреждения (воспаление и некроз гепатоцитов).

Аспартатаминотрансфераза (АСТ). Сочетанное измерение АСТ и АЛТ применяется для дифференциации патологий печени от повреждений мышц. Соотношение уровней АСТ/АЛТ (коэффициент Де Ритиса) < 1 характерно для вирусного гепатита, холестатического синдрома (чаще внутрипеченочного холестаза), токсического гепатита, инфекционного мононуклеоза. Отношение АСТ/АЛТ > 1 наблюдается при циррозах печени, метастазах в печень, инфаркте миокарда. Для алкогольного поражения печени отношение АСТ/АЛТ чаще бывает более 2. Соотношение уровней АСТ/АЛТ < 1 — слабое повреждение печени, но при АСТ/АЛТ > 1 — множественные, часто хронические патологии печени.

Аполипопротеин А1. Основной аполипопротеин, входящий в состав ЛПВП. В норме ЛПВП имеет противовоспалительные функции и ингибирует способность ЛПНП стимулировать хемотаксис моноцитов. Сравнительно недавно неожиданно обнаружилось, что ЛПВП — это компонент острой фазы. Более того, при острой фазе ЛПВП становится *провоспалительным* и повышает способность ЛПНП стимулировать хемотаксис моноцитов. Существенно, что при воспалительном процессе уровни одних белков, связанных с ЛПВП, *возрастают*, а уровни *других — падают*. Возрастают уровни ассоциированных с ЛПВП: 1) сывороточного амилоидного белка А и аполипопротеинов Апо Е, Апо А-IV, Апо А-V. *Снижаются уровни Апо А1 и параоксоназы 1* [13]. Многократно показано и подтверждено, что с *повышением стадии фиброза сывороточный уровень Апо А1 снижается*.

Параоксоназа (PON1). Синтезируется в печени. Связана с ЛПВП, расщепляет окисленные фосфолипиды.

ды, находящиеся в составе окисленных частиц ЛПНП и ЛПВП, и тем самым участвует в функционировании антиоксидантной системы. Имеет *противовоспалительное* действие. Хронические заболевания печени связаны с повышением тяжести оксидативного стресса и перекисным окислением липидов. Показано, что у пациентов с хроническими заболеваниями печени (хронический ВГС, хронический алкоголизм) сывороточные уровни PON1 понижены [14, 15]. Полагается весьма перспективным маркером некровоспалительных процессов, связанных с фиброзом [16, 17].

Альфа-2-макроглобулин (A2M), белок острой фазы воспаления, положительный реактант. В печени *активирует stellatные клетки и стимулирует фиброгенез*. Сывороточный гликопротеин, основной ингибитор протеолитических каскадных систем: 1) комплемента, 2) коагуляции и 3) фибринолиза. A2M ингибирует эластазоподобные и химотрипсिनотипные протеиназы, которые поступают из гранулоцитов в воспалительные экссудаты и вызывают вторичное повреждение тканей. A2M связывается с этими протеиназами, в таком комплексе опознается макрофагами и удаляется. *Повышенный A2M — маркер тяжести воспалительного процесса в печени.*

Гаптоглобин. Связывает свободный гемоглобин (высвобождающийся из эритроцитов) с образованием комплекса, имеющего пероксидазную активность. Участвует в утилизации некоторых патогенных бактерий. Удаляет продукты повреждения за счет транспортных белков плазмы. *Положительный реактант острой фазы. Имеет отрицательную связь с фиброзом печени. Пониженный гаптоглобин — маркер тяжести воспалительного процесса в печени.* С помощью флуоресцентной техники показано, что сывороточный уровень гаптоглобина значительно снижен у пациентов с циррозом печени [18].

Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТ). По крайней мере 5 процессов повышают активность ГГТ: цитолиз, холестаз, интоксикация алкоголем, опухолевый рост в печени и воздействие гепатотоксичных препаратов (лекарственный гепатит). ГГТ — чувствительный, но неспецифичный индикатор поражения желчных канальцев. *Наиболее высокие концентрации ГГТ — признак фиброза, обусловленного поражением канальцевой системы печени или следствие сдавления желчных капилляров/протоков соединительной тканью.*

Количество тромбоцитов — используется как показатель тяжести фиброза. Фиброз печени может приводить к тромбоцитопении из-за нарушения синтеза тромбопоэтина и/или из-за секвестрирования тромбоцитов в увеличенной селезенке. Показано, что количество тромбоцитов может дискриминировать стадию фиброза F4 от стадий F1–F3 у 75–80% пациентов с хроническим гепатитом [19]. Количество тромбоцитов $< 150 \times 10^9$ л имеет положительное предиктивное значение, составлявшее 90% для фиброза, в то время как

пограничный уровень $\geq 150 \times 10^9$ л имел для цирроза отрицательное предиктивное значение $> 90\%$ [20]. Количество тромбоцитов, а также протромбиновое время применяются в качестве дополнительных показателей во многих неинвазивных тестах на фиброз. Например, подсчет тромбоцитов применяется в таких тестах как APRI, Model 3, Forns index, Fibrometer и FibroIndex (см. ниже).

Прямые биомаркеры фиброза

Как говорилось, сывороточные уровни экстрацеллюлярных матриксных белков отражают баланс между гепатитным фиброзом и фибролизом. Некоторые из этих белков успешно применяются как маркеры в различных панелях, предназначенных для диагностики фиброза. *Принципиальное ограничение применимости прямых биомаркеров фиброза: они могут повышаться и при состояниях, к нему отношения не имеющих, например, при системных воспалениях или при почечной недостаточности.*

Гиалуроновая кислота (ГК). Полисахарид, присутствующий в экстрацеллюлярном матриксе и повышающийся в сыворотке пациентов с фиброзом печени. Диагностическая точность ГК выше таковой у N-терминального пептида проколлагена III (PIINP) [21, 22]. Более того, ГК — точный маркер тяжелого фиброза при неалкогольной жировой болезни печени [23].

Цитокератин 18. Caspase-cleaved cytokeratin 18 (СК18-Asp396), белок, выходящий из гепатоцитов при их апоптозе. Согласно недавним исследованиям, это перспективный маркер хронических заболеваний печени. Его сывороточные уровни у больных, страдающих неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ), выше, чем у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (ВГС). Это свидетельствует о том, что при НАСГ гибель гепатоцитов, вызванная апоптозом, выше, чем при ВГС [24]. На данный момент СК 18 — единственный маркер, специфичный именно для НАСГ [25].

Прямые маркеры экстрацеллюлярного матрикса

Проколлагеновые пептиды. N-терминальный пептид проколлагена III (PIINP) — продукт расщепления коллагена, предложен как сывороточный маркер фиброза печени еще в 1979 г. [26]. Однако при исследовании пациентов с хроническим ВГС этот маркер имел весьма умеренную диагностическую точность [27, 28].

Матриксные металлопротеиназы (ММП) и их ингибиторы. ММП — это большое семейство ферментов, расщепляющих белки клеточного матрикса, когда такие белки в избытке (фибролиз). Когда же необходим синтез белков матрикса, синтез ММП ингибируется тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИМП). Поскольку, таким образом, и ММП и ТИМП участвуют в обмене белков матрикса, сывороточные уровни ММП и ТИМП, как полагалось, могут быть биомаркерами фиброза. Однако исследования по выяснению корреляции уровней различ-

ных MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-9), а также TIMP-1 и TIMP-2 со стадиями фиброза дают, к сожалению, не всегда согласующиеся результаты [29–31]. Тем не менее, измерение уровня TIMP-1 используется в некоторых комплексных панелях на фиброз (см. ниже).

YKL-40. Это гликопротеин, участвующий в расщеплении экстрацеллюлярного матрикса. При исследовании пациентов с хроническим гепатитом было обнаружено, что у YKL-40 диагностическая точность по отношению к фиброзу сходна с таковой у ГК, но по отношению к циррозу — ниже, чем у ГК [32].

Перечислим сначала кратко основные тесты на фиброз и маркеры и показатели, в них входящие, а затем рассмотрим каждый из тестов более подробно.

Неинвазивные тесты на фиброз печени

Непрямые

APRI: АСТ, количество тромбоцитов.

AST/ALT ratio (AAR): АЛТ/АСТ.

Model 3: АСТ/АЛТ, протромбиновое время.

FIB-4: АЛТ/АСТ, количество тромбоцитов, возраст.

FibroIndex: АСТ, гамма-глобулин, количество тромбоцитов.

Wai CT et al. 2003: АСТ, щелочная фосфатаза, количество тромбоцитов.

Hui AY et al. 2005: Билирубин, альбумин, количество тромбоцитов, индекс массы тела.

Forns' score: ГГТ, холестерин, количество тромбоцитов, возраст.

Fibrotest: А2М, гаптоглобин, Апо1, ГГТ, билирубин.

ActiTest: А2М, гаптоглобин, Апо А1, АЛТ, АСТ, ГГТ, билирубин.

FibroMaxTest: А2М, гаптоглобин, Апо А1, АЛТ, АСТ, ГГТ, триглицериды, билирубин, холестерин, глюкоза, пол, возраст, вес, рост.

Прямые

MP3: PIIN и MMP-1.

Larrousse M., et al 2007: ГК, TIMP-1.

ELF test: ГК, PIINP и TIMP-1.

Комплексные фиброзные панели, включающие прямые и непрямые биомаркеры

Fontana RJ et al. 2008: ГК, TIMP-1, количество тромбоцитов.

SHASTA. ГК, АСТ, альбумин.

FIBROSpect II: А2М, ГК, TIMP-1.

Zeng's score: А2М, ГГТ, ГК, возраст.

Hepascore: А2М, ГК, ГГТ, билирубин, возраст, пол.

Fibrometer: А2М, ГК, ферритин, АЛТ, АСТ, мочевины, количество тромбоцитов, протромбиновое время, причина заболевания печени, возраст.

Тесты, основанные на непрямах маркерах фиброза

APRI тест: (aspartate aminotransferase to platelet ratio index) индекс отношения АСТ/количество тромбоцитов.

Описан в 2003 г и рассчитывается по специальной формуле [33]. Точность этого теста для диагностики фиброза и цирроза подтверждена несколькими внешними исследованиями [34–38]. Значения индекса APRI $\leq 0,3$ и $\leq 0,5$ исключают значимый фиброз и цирроз, а значения $\geq 1,5$ указывают на клинически значимый фиброз (шкала METAVIR) у пациентов с хроническим ВГС. У пациентов с неалкогольным жировым заболеванием печени значения APRI имеют тенденцию повышаться с повышением тяжести фиброза [39]. Весьма эффективным может быть последовательное применение APRI и FIBROSpect II (см. ниже) тестов. При использовании APRI для начального скрининга могут быть правильно диагностированы $> 50\%$ пациентов со средними уровнями фиброза (ВГС). Если большое количество больных попадает в «недиагностируемую зону», целесообразно применение более дорогостоящего FIBROSpect II теста [40]. У пациентов, инфицированных ВИЧ-1 и ВГС, значения индекса APRI $\geq 1, 8$ в 75% случаях указывали на фиброз (шкала METAVIR), а значения $< 0,6$ исключали фиброз в 87% случаев [41]. В общем, APRI тест достаточно прост, надежен и экономичен, его применение может снизить количество биопсий, особенно у больных хроническим ВГС [42].

AAR: AST/ALT ratio — соотношение АСТ/АЛТ. Традиционно определение баланса АСТ/АЛТ используется как неинвазивный метод оценки тяжести хронических заболеваний печени (ХЗП), так как утяжеление этих патологий связано с повышением значений АСТ/АЛТ. Действительно, при прогрессирующих заболеваниях печени: а) повышается выход митохондриальной АСТ, б) удаление (клиренс) АСТ снижается и в) нарушается синтез АЛТ. В 1988 г. соотношение АСТ/АЛТ было предложено как индикатор тяжести цирроза, при этом утверждалось, что показатели АСТ/АЛТ > 1 свидетельствуют уже о циррозе [43]. Более того, этот показатель действенен и для прогнозирования (в течение одного года) его течения. При этом прогрессирование цирроза, определяемое гистологически, коррелировало с ростом значений АСТ/АЛТ [44].

И более того, оказалось, что показатель АСТ/АЛТ может также служить индикатором цирроза у больных первичным билиарным циррозом [45].

Весьма показательна информативность АСТ/АЛТ в отношении первичного склерозного холангита (ПСХ). Средние значения АСТ/АЛТ у пациентов с ПСХ при первом и последнем гистологических исследованиях были выше ($1,3 \pm 0,5$ и $1,6 \pm 0,7$ соответственно), чем у пациентов без данной патологии ($0,7 \pm 0,4$ и $1,0 \pm 0,4$, соответственно). Значения АСТ/АЛТ ≥ 1 были сильным предиктором смерти, связанной с патологией печени и с ортотопической трансплантацией печени, и коррелировали с повышением соответствующих рисков в 2–4 раза [46].

В целом, значения АСТ/АЛТ могут быть индикаторами цирроза, связанного с вирусными гепатитами,

алкогольным заболеванием печени, с первичным билиарным циррозом и циррозом, связанным с первичным склерозным холангитом. Отметим, однако, что специальные исследования, с одной стороны, хотя и подтвердили высокую диагностическую точность этого теста для предсказания цирроза [47], но с другой — показали, что по своей точности AAR тест уступает другим неинвазивным тестам на фиброз [48].

Model 3: АСТ/АЛТ, количество тромбоцитов, протромбиновое время (МНО). Тест, предназначенный для прогнозирования или исключения цирроза у пациентов с хроническим ВГС. Индекс подсчитывается по специальной формуле. При пограничном уровне $< 0,20$ цирроз может быть исключен с отрицательным предиктивным значением в 99% [49]. Тест основан на том, что утяжеление фиброза и увеличение портального давления связаны со снижением синтеза тромбopoэтина гепатоцитами, повышенным секвестрированием тромбоцитов в селезенке и со снижением клиренса АСТ [50–52].

FIB-4: АЛТ/АСТ, количество тромбоцитов, возраст. При исследовании пациентов с ВГС показано, что пограничное значение FIB-4 индекса (вычисляется по специальному алгоритму) $< 1,45$ имело отрицательное предиктивное значение 94,7% при чувствительности 74,3%. FIB-4 индекс больший, чем 3,25, подтверждал фиброз (стадии F3–F4, Ishak) в 82,1% случаев со специфичностью в 98,2%. Это позволило правильно диагностировать фиброз у 72,8% пациентов из 847, которым была проведена биопсия. Авторы полагают, что «при значениях, не входящих в диапазон 1,45–3,25, определение FIB-4 индекса — это простой, точный и недорогой метод для оценки фиброза печени, результаты которого согласуются с таковыми у FibroTest» [53]. В недавнем исследовании пограничный уровень $\leq 1,45$ дифференцировал умеренный фиброз от тяжелого с отрицательным предиктивным значением 86%, при чувствительности 71,1% и специфичности 73,1%. Значения FIB-4 индекса меньше, чем 1,45, были неинформативны. В общем, FIB-4 индекс оказался более точным, чем индекс APRI, и коррелировал с результатами FibroTest в 89% случаев, исключавших фиброз. Авторы считают, что определение FIB-4 индекса — «простой, точный и недорогой метод для исключения выраженного фиброза при хроническом ВГС, этот метод имеет большие преимущества для применения в развивающихся странах с эндемическим ВГС» [54]. FIB-4 тест эффективен и для оценки фиброза печени при инфекции ВГС и ВИЧ-1 (шкала фиброза Ishak). У таких пациентов при пограничном уровне $< 1,45$ отрицательное предиктивное значение, исключающие фиброз (стадии 4–6), составляло 90% при чувствительности 70%. При пограничном уровне $> 3,25$ положительное предиктивное значение составляло 65% при специфичности 97%. Применение этих пограничных уровней позволило 71% пациентов избежать биопсии [55].

FibroIndex: АСТ, гамма-глобулин, количество тромбоцитов. Разработан на основе исследования 402 паци-

ентов с ВГС, вычисляется по специальной формуле. Данная комбинация маркеров диагностировала фиброзы, связанные с ВГС, более эффективно, чем индексы Forns и APRI, что позволило избежать биопсии 101 пациенту (35%). При терапии показатели FibroIndex прямо коррелировали с изменениями тяжести фиброза, которые определялись биопсией, индексы Forns и APRI этого не показывали. Так, значения FibroIndex значительно понизились у 14 пациентов, у которых наблюдалось значительное улучшение, но повысились у 5 больных, у которых произошло ухудшение [56]. Как известно, примерно у трети больных с выраженным фиброзом уровни АЛТ нормальные, однако FibroIndex диагностировал фиброз и у этой группы пациентов [56].

Отметим, однако, что в недавнем специальном внешнем исследовании показано, что тесты APRI, AAR, Fibroindex, Fibrotest и Forns' index все же имеют пониженную эффективность у пациентов с фиброзом (ВГС) и с нормальными уровнями АЛТ. Авторы считают, что в таких случаях для диагностики «биопсия все еще необходима» [57].

Wai CT et al. 2003: АСТ, щелочная фосфатаза, количество тромбоцитов. Данная комбинация маркеров была эффективной для диагностики пациентов, страдающих хроническим ВГС. Значения в диапазоне ≥ 3 (шкала Ishak) предсказывали фиброз у 51% пациентов и цирроз у 81% пациентов [58].

Hui AY et al. 2005: общий билирубин, альбумин, количество тромбоцитов, индекс массы тела. Данный тест является независимым предиктором мостовидного фиброза (Ishak, стадии 3–6). При пограничном уровне 0,15 имел отрицательное предиктивное значение 0,92 и позволил исключить выраженный фиброз у 83 (35%) из 235 пациентов [59].

Forns' index: ГГТ, холестерин, количество тромбоцитов, возраст. Вычисляется по специальной формуле. При пограничном уровне менее 4,2 выраженный фиброз (стадии F2–F4) исключался у 36% пациентов (у 125 из 351) с отрицательным предиктивным значением 96% [60–63].

FibroTest/Fibrosure: Это семейство тестов **FibroMax**, предназначенных для диагностики тяжести фиброзов, имеющих различную этиологию.

FibroTest: А2М, гаптоглобин, Апо А1, АЛТ, ГГТ, общий билирубин. Оценивает тяжесть фиброза, связанного с алкогольным заболеванием печени, неалкогольным жировым заболеванием печени, хроническими вирусными гепатитами В и С (также и в случаях инфекции ВИЧ-1). Предсказывает быстрые и отдаленные осложнения и летальность при хроническом вирусном гепатите С.

ActiTest: включает А2М, гаптоглобин, Апо А1, АЛТ, АСТ, ГГТ, общий билирубин. Оценивает вирусную некровоспалительную активность, применяется при хронических гепатитах В и С.

FibroMaxTest: включает А2М, гаптоглобин, Апо А1, АЛТ, АСТ, ГГТ, триглицериды, общий билирубин, общий холестерин, глюкозу, пол, возраст, вес, рост. Имеет 5 различных алгоритмов (формул) обработки результатов: **FibroTest** (фиброз), **ActiTest** (вирусные гепатиты В и С), **NashTest** (НАСГ — неалкогольный стеатогепатит), **AshTest** (АСГ — алкогольный стеатогепатит), **SteatoTest** (стеатоз), который оценивают тяжесть фиброза, связанного с соответствующей этиологией [64–68]. Тест имеет торговую марку Fibrotest™ (Biopredictive, Paris, France) в Европе и Fibrosure™ (LabCorp, Burlington, NC) в США. В отличие от ранее описанных непрямых тестов на фиброз, данный тест предусматривает подсчет результата измерений каждого образца с помощью запатентованного алгоритма и оплату каждого такого подсчета через соответствующий сайт в Интернете. Тест прошел внутреннюю и внешнюю валидацию [69–72]. Недавнее исследование, проведенные разработчиками, показало, что FibroTest лучше предсказывает осложнения хронического гепатита С, чем гистологическое определение стадий фиброза [73]. Диагностическая точность FibroTest зависит от: 1) гемолиза, который снижает уровень гаптоглобина, 2) синдрома Жильберта, при котором повышен билирубин, и 3) наличествующей у пациента инфекции, которая повышает уровни А2М и гаптоглобина, являющихся острофазными белками [74].

Тесты, основанные на прямых маркерах фиброза

MP3: PIIINP/MMP-1 index. Соотношение уровней N-терминального пептида проколлагена PIIIN (маркер фиброгенеза) и матриксной металлопротеиназы MMP-1 (участвует в фибролизе). Показатели указанного соотношения хорошо дискриминировали стадии фиброза (F2/F3/F4) по шкале METAVIR [75, 76].

Larrousse M., et al 2007: ГК, TIMP-1. У пациентов, инфицированных ВГС и ВИЧ-1, показатели ГК/TIMP-1 хорошо дискриминировали стадии фиброза F0–F1 до F2–F3 по шкале METAVIR [77].

ELF (Enhanced liver fibrosis — повышенный фиброз печени): ГК, PIIINP, TIMP-1, возраст. Разработан благодаря многоцентровым исследованиям (1021 пациент, хронические заболевания печени разной этиологии). Разработанный алгоритм позволяет диагностировать фиброз с чувствительностью 90% и исключать фиброз с отрицательным предиктивным значением 92%. Широкомасштабная проверка при хроническом ВГС, первичном билиарном циррозе, алкогольном и неалкогольном жировом заболевании печени (НАЖЗП) показала, что ELF test отражает тяжесть фиброза так же хорошо, как биопсия [78]. Дальнейшие исследования показали, что ELF test диагностирует прогрессирующий фиброз у педиатрических пациентов с НАЖЗП и тем самым выявляет пациентов, которые нуждаются в дальнейшем гистологическом исследовании или в терапии. Интерес-

но, что ELF test предсказывает фиброз у детей с НАЖЗП с большей специфичностью и чувствительностью, чем у аналогичных взрослых пациентов [79]. Тест имеет торговую марку ELFTM — Enhanced Liver Fibrosis, производится Siemens Medical Solutions Diagnostics (Tarrytown, NY, USA).

Комплексные фиброзные панели — сочетание прямых и непрямых биомаркеров

SHASTA index: АСТ, альбумин, ГК. У пациентов с коинфекцией ВГС и ВИЧ-1 значения указанного индекса дискриминировали начальные стадии фиброза (F0–2) от тяжелых (F3–6), шкала Ishak [80].

Fontana RJ et al. 2008: ГК, TIMP-1, количество тромбоцитов. Тест разработан при наблюдении 513 пациентов с ВГС, нефрагментированные образцы биопсии оценивались с помощью компьютеризированной морфометрии. Индекс вычисляется по специальной формуле. 62% пациентов имели нециррозный фиброз (стадии по шкале Ishak 2–4), 38% пациентов имели цирроз (стадии 5, 6). Авторы полагают, что указанная панель маркеров диагностирует цирроз точнее, чем все ранее опубликованные методы. Более того, авторы утверждают, что «сильная корреляция уровней данных сывороточных маркеров с показателями шкалы Ishak свидетельствует о том, что сывороточные маркеры фиброза отражают картину (pattern) фиброза более точно, чем количество коллагена печени» [81].

Fibrospect II: А2М, ГК, TIMP-1. Данный тест за счет измерения уровней указанных маркеров и алгоритма, вычисляющего Fibrospect II индекс (FS индекс в диапазоне 0–1), предсказывает фиброз достаточно точно и надежно [82, 83]. Тест прошел внешнюю валидацию и также был валидирован в комплексе с тестами APRI, Forns index, Fibrotest и Fibrometer (см. ниже) [84]. Так, для подтверждения точности этого теста результаты вычисления FS индекса (142 пациента) соотносили с результатами биопсии (шкалы Knodell и Ishak). При пограничном уровне индекса 0,42 обнаружено, что 50 из 54 пациентов имели, согласно шкале Ishak, стадии фиброза 3–6 и выраженный фиброз F2–F4 согласно шкале METAVIR. 58 из 88 пациентов (шкала Ishak 0–2) имели или легкий фиброз, или не имели его вовсе (METAVIR F0–F1). В целом, чувствительность Fibrospect II составляла 93%, специфичность 66%, общая точность 76%. Однако ограничение данного теста в том, что его чувствительность и специфичность уменьшаются в диапазоне индексов между 0,42 и 0,80 [85]. Панель дифференцировала умеренный фиброз (F0–F1, METAVIR) от тяжелого (F2–F4) с чувствительностью 71,8%, специфичностью 73,9%, положительным предиктивным значением 60,9%, отрицательным предиктивным значением 82,3% и общей точностью 73,1% [86]. При проверке данного теста (252 пациента с хроническим ВГС, включая 50 пациентов, перенесших трансплантацию печени) чувствительность и специфичность Fibrospect II со-

ставляли 83,5% и 66,7% соответственно, точность составляла 80,2%. Сходимость результатов Fibrospect II тестирования и биопсии в группе больных с трансплантированной печенью составляла 73% [87]. Тест разработан Prometheus Laboratories Inc., San Diego, CA, USA.

Zeng's score: А2М, ГГТ, ГК, возраст. Тест и алгоритм расчета указанного индекса были разработаны для выраженного фиброза (F2–4, METAVIR) у пациентов, страдающих хроническим ВГС (HBeAg положительным). При пограничном значении <3,0 фиброз (F2–F4) исключался с высокой точностью (отрицательное предиктивное значение 86,1%, положительное предиктивное значение 70,1%, чувствительность 94,8%). А при пограничном уровне >8,7 фиброз правильно диагностировался с положительным предиктивным значением 91,1%, с отрицательным предиктивным значением 51,6% и специфичностью 95,2%. В целом, применение индекса Zeng's score уменьшило необходимость проведения биопсии у 35,5% пациентов [88].

Hepascore: А2М, ГК, ГГТ, билирубин, возраст, пол. Измерение этих маркеров и вычисление индекса Hepascore (0–1), как показывают разработчики, имело высокую дифференциальную диагностическую точность в различении выраженного и тяжелого фиброза (METAVIR, F2, F3) и цирроза (F4) при ВГС. При значениях Hepascore ≥0,5 чувствительность для диагностики выраженного цирроза была 92%, специфичность 67%. При индексе <0,5 тяжелый фиброз диагностировался со специфичностью 81% и чувствительностью 95%. Показатели Hepascore <0,84 диагностировали цирроз со специфичностью 84% и чувствительностью 71%. Показатели ≥0,5 имели чувствительность и специфичность в 89% и 63% для выраженного фиброза, в то время как показатели <0,5 диагностировали тяжелый фиброз со специфичностью 74% и чувствительностью 88% [89].

Сочетание тестов Hepascore и APRI (АСТ/тромбоциты) имеет высокую диагностическую точность (91%) и позволяет избежать биопсии 45% пациентов (всего исследовано 467 пациентов с ВГС) [90].

Fibrometer: Это комплекс из 6 тестов, предназначенных для определения стадий фиброза (Fs) и характеристики воспалительного процесса (Fa) при трех основных патологиях печени: при ВГС, при алкогольном и неалкогольном жировом заболевании печени (табл. 2).

При разработке этого теста для выбора наиболее оптимальной комбинации маркеров проверили 51 сывороточный маркер и сопоставили картины их активностей со стадиями фиброза. По мнению авторов, разработанная ими панель по своей чувствительности и специфичности превосходит такие тесты как Fibrotest, Fibrospect, ELFG, APRI и Forns scores [91]. Разработчики утверждают, что Fibrometer имеет высокую диагностическую точность и является «единственным тестом, способным корректно классифицировать 100% пациентов с ВГС, имеющих и не имеющих цирроза. В реальных

условиях воспроизводимость тестов Fibrometer выше, чем у биопсии печени или чем у ультразвуковой эластометрии» [92]. Более того, авторы утверждают, что при диагностике фиброза у пациентов с НАЖЗП Fibrometer имеет более высокую специфичность по сравнению с APRI тестом и обеспечивает более надежную диагностику этой патологии [93]. Тесты Fibrometer и запатентованный алгоритм доступны на коммерческой основе в компании BioLiveScale (Angers, France). Для оценки фиброза при вирусных гепатитах предлагается тест Fibrometer, при алкогольных заболеваниях печени — FibrometerA и при метаболической стеатопатии (metabolic steatopathy) — FibrometerS.

Таблица 2

Биомаркеры комплекса тестов Fibrometer

	Вирус		Восп. активн.	АЗП		НАЖЗП	
	Fs	Fa		Fs	Fa	Fs	Fa
Возраст	X			X		X	
Пол	X					X	
Вес						X	
А2М	X	X	X	X	X		
Гиалурон. к-та	X	X		X	X		X
Тромбоциты	X	X	X		X	X	
Протромбин. индекс	X		X	X	X		X
АСТ	X					X	X
АЛТ			X			X	X
ГГТ		X					
Билирубин		X					
Мочевина	X						
Ферритин						X	
Гликемия						X	X

Fs — тяжесть фиброза (стадии), Fa — воспалительная активность, АЗП — алкогольные заболевания печени, НАЖЗП — неалкогольные жировые заболевания печени.

Маркеры фиброза у реципиентов трансплантированной печени

Какие маркеры измерять лучше всего, чтобы у реципиентов трансплантированной печени обнаружить рецидивы фиброза на самых ранних стадиях?

Benlloch S et al. 2005: АСТ, альбумин/общий белок, протромбиновое время, время, прошедшее после трансплантации. Тест разработан на основе наблюдения 188 реципиентов трансплантированной печени, страдавших ВГС. Указанные маркеры являлись независимыми предикторами фиброза. При пограничном уровне в 0,2 панель маркеров и специальный алгоритм расчета имели чувствительность, специфичность, положительное и

отрицательные предиктивные значения, составлявшие 87, 71, 49 и 95% соответственно [94].

В другом исследовании при сравнении эффективности для выявления фиброза ($> F2$, METAVIR) у женщин — реципиентов трансплантированной печени (ВГС) таких показателей как АСТ/АЛТ, APRI, Forns' index и Model 3 было найдено, что наилучшими были значения $APRI > 1,4$, которые имели чувствительность 91% и специфичность 75%. Соответствующие показатели для мужчин составляли 60 и 77% соответственно [95].

Весьма интересны результаты проспективного исследования, в котором у реципиентов трансплантированной печени (19 пациентов с ВГС, 18 с алкогольным заболеванием печени) уровни биомаркеров измерялись через 3 мес. после трансплантации и через 1 год. Тяжелый рецидив ВГС определялся как стадия фиброза $\geq F1$ (METAVIR), развивавшаяся в течение 1 года. Как оказалось, у реципиентов с рецидивом ВГС были повышены уровни: 1) моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1), 2) растворимой васкулярной молекулы клеточной адгезии-1 (soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1), 3) индуцируемого интерфероном белка-10 (interferon-inducible protein-10, IP-10) и 4) гиалуроновой кислоты. Авторы считают, что «определение этих биомаркеров может быть полезным для раннего выявления пациентов, которым необходим более агрессивный терапевтический подход» [96].

В другом исследовании в течение 12–108 месяцев наблюдались 50 реципиентов после ортотопической трансплантации печени (ОТП). Показаниями для ОТП были: ВГС (23% случаев), ВГВ (14%), алкогольные заболевания (33%), холестазные заболевания (cholestatic disease) (19%), другие патологии — 11% случаев. Была обнаружена корреляция между стадиями фиброза (METAVIR) и уровнями альбумина, АСТ, АЛТ и ГГТ. Показатели APRI и FIB-4 коррелировали со стадиями фиброза при всех этиологиях, а также в группе реципиентов, не имевших ВГС. Авторы полагают, что «тесты APRI и FIB-4 позволяют точно предсказывать выраженный фиброз у реципиентов после ОТП. Сходные предиктивные характеристики обнаружены и для подгруппы больных, не имевшей ВГС. В целом, показатели APRI и FIB-4 могут использоваться в клинической практике в контексте контроля последствий ОТП, независимо от статуса инфицированности ВГС» [97].

Заслуживают внимания и результаты ретроспективного исследования применимости FibroTest и ActiTest для мониторинга 23 пациентов, перенесших трансплантацию печени по поводу цирроза, связанного с ВГС. Длительность исследования — 1 год после трансплантации. Указанные тесты были проведены 23 донорам и 23 реципиентам и сопоставлены с биопсией (METAVIR) и с наличием ВГС в случаях рецидивов. Как оказалось, у 8 из 23 (35%) реципиентов после 48 недель показатели FibroTest не нормализовались. Все эти больные имели:

а) рецидивы ВГС и были «ВГС позитивными» (ПЦР), б) умеренную или тяжелую воспалительную активность согласно ActiTest. Как оказалось, у этих больных биопсия показала: 1) три острых минимальных отторжения, 2) пять острых гепатитов, среди них: а) один с инфекцией цитомегаловируса, б) один с крупноклеточной лимфомой вируса Эпштейна–Барра. Все 8 реципиентов имели рецидив ВГС после 48 недель. У 10 из 23 реципиентов (43%) показатели FibroTest нормализовались через 4 недели, а показатели ActiTest у 15 из 23 реципиентов (65%) нормализовались через 48 недель. Динамика сывороточных уровней маркеров FibroTest — ActiTest показала, что их профиль, имевший место у реципиентов перед трансплантацией, персистирует 1 неделю после нее, а затем в течение 1 мес. плавно замещается профилем сывороточных белков, характерных для трансплантата (донора) [98].

Какая фиброзная панель лучше?

Для ответа на этот крайне непростой вопрос проведено большое количество специальных исследований. Так, эффективность тестов APRI, Fibrometer, Fibrotest, Forns' score, Hepascore, МРЗ сравнивалась в проспективном исследовании (наблюдались 180 пациентов с хроническим ВГС в период с 2002 по 2004 г). Результаты биопсий оценивались по шкале METAVIR. Наилучшие результаты дало сочетанное применение нескольких тестов, которые в наиболее удачных комбинациях надежно диагностировали или отсутствие фиброза, или его тяжелую стадию. Такие хорошие результаты были получены только для одной трети пациентов, а вот промежуточные стадии фиброза диагностировались с меньшей надежностью. Авторы полагают, что «текущие неинвазивные методы оценки фиброза печени дают надежную информацию у одной трети пациентов с хроническим ВГС, особенно когда эти методы используются совместно» [99]. Затем при наблюдении 825 пациентов в четырех независимых центрах было показано, что по своей точности тесты располагаются так (по убыванию): FibroMeter, Fibrotest, APRI и Hepascore [100]. В другом недавнем исследовании было показано, что при диагностике фиброза, связанного с ВГС, эффективность тестов была следующей (по убыванию): FibroMeter, APRI, Fibrotest, Hepascore, FIB-4 [101]. В двух других сравнительно больших исследованиях (1056 пациентов в пяти клиниках, фиброз, связанный с ВГС, шкала METAVIR) тесты по своей точности расположились так: FibroMeter, Fibrotest, Hepascore, APRI [102].

В недавнем исследовании FibroTest, FibrometerA, Hepascore и другие тесты сравнивались при наблюдении 218 пациентов с алкогольным заболеванием печени. Показано, что при диагностике выраженного фиброза и цирроза эффективность FibroTest, FibrometerA и Hepascore была выше, чем у «непатентованных» биомаркеров APRI, Forns и FIB-4. Наиболее точным и прогностически значимым был FibroTest. Как считают авторы

Таблица 3

Сравнительная точность комплексных фиброзных панелей [108]

	Погран. уровень.	Чувствит. %	Специф. %	Правильная классиф. %	Положит. предикт. знач. %	Отр. предикт. знач. %
FibroTest						
≥ F2	0,43	70	72	71	80	61
≥ F3	0,59	73	79	77	67	83
F4	0,74	75	85	83	50	94
FibroMeter						
≥ F2	0,46	73	68	71	78	62
≥ F3	0,69	72	85	81	74	84
F4	0,83	81	85	84	52	96
Hepascore						
≥ F2	0,48	67	68	67	77	57
≥ F3	0,76	72	87	82	76	84
F4	0,9	80	89	88	60	96
Zeng' score						
≥ F2	17,2	74	66	70	77	62
≥ F3	18,9	70	79	76	66	82
F4	21,0	75	87	85	54	94

(разработчики FibroTest), «у пациентов с алкогольными заболеваниями печени тесты FibrometerA и Hepascore не улучшают диагностических и прогностических значений, которые имеет FibroTest» [103].

В еще одном исследовании панели Fibrotest, Hepascore, Fibrometer, SHASTA, APRI, Forns index и FIB-4 сравнивались при наблюдении 272 пациента, инфицированных ВИЧ-1 и ВГС. Количество правильно диагностированных пациентов (F2, METAVIR) для тестов Fibrotest, Hepascore, Fibrometer составляло 62, 68 и 71% соответственно. Тесты FIB-4, APRI и Forns имели более низкую точность и правильно диагностировали только 37–61% пациентов. Сочетание Fibrotest, Hepascore, Fibrometer не повысило точности диагностики. Авторы полагают, что «у пациентов, инфицированных ВИЧ-1/ВГС, тесты Fibrometer, Hepascore и Fibrotest превосходят другие неинвазивные биомаркеры, применяемые для диагностики фиброза печени» [104].

В пяти независимых госпиталях наблюдались 1056 пациентов с хроническим ВГС. При использовании наилучших пограничных уровней правильная диагностика тяжелого фиброза и цирроза составляла:

	Тяжелый фиброз, %	Цирроз %
FibroMeter	90,1	100
FibroTest	78,2	95,1
Hepascore	73,8	94,9
APRI	71,4	88,0

100%-ные отрицательные предиктивные значения по отношению к тяжелому фиброзу и циррозу наблюдались у пациентов в следующем % случаев [105]:

	Тяжелый фиброз, %	Цирроз %
FibroMeter	15,4	15,4
FibroTest	3,6	31,9
Hepascore	0,3	24,6
APRI	1,4	1,4

Сравнение эффективности тестов APRI, Forns и FIB-4 (как по отдельности, так и при сочетанном применении, 324 пациента, инфицированных ВИЧ-1/ВГС) показало, что при использовании нижних и верхних пограничных уровней все три теста имели сходные характеристики [106].

При сравнении панелей FibroSure и FibroSpect II (95 пациентов с хроническим ВГС) тесты для диагностики фиброза (METAVIR F2–F4) имели высокую чувствительность — 1,00 и 0,95 соответственно, но сравнительно низкую специфичность — 0,61 и 0,66 соответственно [107].

И наконец, в марте 2009 г. опубликованы результаты сравнения панелей Fibrotest, Fibrometer, Hepascore и Zeng's score, которые проверялась при наблюдении 108 пациентов, инфицированных ВИЧ-1/ВГС и имевших различные стадии фиброза, установленные с помощью биопсии (METAVIR, F0–F1, n = 47; F2, n = 28; F3,

n = 17 и F4, n = 16). Сравнительная эффективность указанных методов представлена в таблице 3 [108].

Авторы отмечают, что «четыре алгоритма, имеющих наивысшую эффективность давали результаты, согласовавшиеся с результатами биопсии, только у 50% пациентов. При этом сочетание двух биохимических панелей не повышало общей разрешающей способности <...> Результаты, полученные с помощью биохимических панелей, должны интерпретироваться с осторожностью и должны быть повторены через несколько месяцев. Более того, в случае инфекции ВИЧ-1 уровни воспалительных маркеров (например, А2М) часто повышаются, а уровни других (количество тромбоцитов) понижаются независимо от статуса печени» [108].

В целом, в неинвазивной диагностике фиброза печени достигнуты значительные успехи, которые позволяют с достаточно высокой надежностью диагностировать тяжелые стадии фиброза и исключать его наличие. Но при промежуточных стадиях фиброза надежность таких тестов заметно снижается. Полагается, что несмотря на несомненные успехи в разработке методов неинвазивной диагностики фиброза, их использование пока не может полностью исключить биопсию печени, но может снизить необходимость ее применения.

Список литературы имеется в редакции.

ВИДЕОЦИФРОВАЯ РЕГИСТРАЦИЯ: НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Т.А. СТАРОВОЙТОВА¹, Н.А. СТЕРИОПОЛО², В.В. ЗАЙКО², Л.П. МАРТЫНКИНА³,
В.А. КУТВИЦКИЙ⁴, А.Е. ТУГОЛУКОВ², С.Г. ВОЛОШУК², Р.Т. ТОГУЗОВ⁵, Ю.Ю. ВЕНГЕРОВ²

¹ НУЗ «ЦКБ № 1 ОАО «Российские железные дороги»

² Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва,

⁴ Институт земного магнетизма, ионосферы и распространения радиоволн РАН
им. Н.В. Пушкова, Троицк

⁵ Российский государственный медицинский университет, Москва

Резюме. Представлены результаты работ в области разработки регистрирующих систем и методов проведения лабораторных исследований на основе видеоцифровой регистрации. Описаны основные принципы использования подходов видеоанализа для целей и задач лабораторной диагностики. Рассмотрены различные разработанные варианты регистрирующих систем в применении к матричным (иммунохимические определения в формате 96-луночного планшета, агглютинационные, биохимические и иммуно-дот исследования в миниатюризованных формах 3×4 и 5×6) и иммунохроматографическим тестам. Систематизированы существующие разработки лабораторных тестов с видеоцифровой регистрацией и определены перспективные направления развития систем видеоцифровой регистрации как новой аналитической технологии.

Ключевые слова: видеоцифровая регистрация, программное обеспечение, иммунохимические исследования, иммунохроматографические тесты, миниатюризация.

VIDEODIGITAL REGISTRATION: NEW PERSPECTIVES IN LABORATORY DIAGNOSTICS

T.A. STAROVOITOVA¹, N.A. STERIOPOLO², V.V. ZAIKO², L.P. MARTYNKINA³, V.A. KUTVITSKY⁴,
A.E. TUGOLUKOV², S.G. VOLOSHCHUK², R.T. TOGUZOV⁵, YU.YU. VENGEROV²

¹ NUZ TSKB N 1 ОАО «Rossijskiye zheleznnye dorogi», Moscow

² A.N. Bach Institute of biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

³ V.A. Engelhardt Institute of molecular biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

⁴ N.V. Pushkov Institute of terrestrial magnetism, ionosphere and radiowave propagation,
Russian Academy of Sciences, Troitsk

⁵ Russian State Medical University, Moscow

Summary. Results of investigations in the field of elaboration of registration systems and methods of laboratory testing on the basis of videodigital registration are presented. The main principles of the use of videoanalysis approaches for the aims and tasks of laboratory diagnostics are described. Different elaborated variants of registration systems in application for matrix (immunochemical definitions in the format of 96-wells plate, agglutinational, biochemical, immune-dot investigations in miniaturized formats of 3×4 and 5×6) and immunochromatography tests are considered. Existing elaborations of laboratory tests with videodigital registration are systematized and perspective directions in progress of videodigital registration systems as new analytical technology are defined.

Key words: videodigital registration, software, immunochemical investigations, immunochromatography tests, miniaturization.

Введение

В течение последнего десятилетия в лабораторной диагностике все более широко используется получение аналитической информации с помощью устройств на основе видеоцифровых камер или сканеров. Сфера применений таких устройств для лабораторных исследований постоянно расширяется благодаря улучшению характеристик выпускаемых серийно сканеров,

цифровых камер, разработкам новых технологических решений и пакетов программного обеспечения. Термин «видеоцифровая регистрация» (ВЦР) для определения технологии регистрации результатов лабораторных исследований был введен в серии работ группы исследователей Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта и Института биохимии им. А.Н. Баха РАН [2, 4, 9, 11].

Встречающееся в работах зарубежных авторов понятие «digital image assay» (наиболее близкий перевод этого термина на русский язык — «компьютерный видеоанализ») подразумевает только получение цифрового изображения и его обработку, тогда как понятие технологии **ВЦР** гораздо шире. В упомянутых работах российских ученых данная технология разрабатывалась не как частный элемент конкретного технического процесса (получения цифрового изображения и его анализа), а как основной компонент систем, открывающих новые возможности видеоцифрового подхода для задач лабораторной диагностики.

Востребованность **ВЦР** как направления развития лабораторной диагностики определяется следующими факторами: 1) появление большого количества новых упрощенных методик и тестов, предназначенных для серийных исследований; 2) развитие лабораторных технологий для выполнения анализа менее квалифицированным персоналом во внелабораторных условиях (технологии «у постели больного»); 3) требования к передаче и хранению информации в электронном виде; 4) все более широкое внедрение лабораторных компьютерных сетей.

Методы **ВЦР** могут быть использованы в качестве альтернативы методам обычной и отражательной фотометрии в приложении к традиционным объектам фотометрических исследований, а в применении к методикам

с визуальной регистрацией предоставляют специалисту по лабораторной диагностике такие существенные преимущества как документирование, объективизацию и регистрацию результатов.

Данная публикация посвящена описанию общих принципов разработки систем регистрации результатов лабораторных исследований на основе технологий **ВЦР** и характеристик ряда таких систем в приложении к конкретным типам лабораторных методов.

1. Принципы получения и обработки информации ВЦР

Методы традиционной фотометрии используются в клинической лабораторной диагностике для регистрации результатов реакций, приводящих к изменению светопропускания или светоотражения объектов с одинаковой оптической плотностью во всех точках, то есть однородных по своей сути. Объектами фотометрии обычно являются гомогенные растворы в кюветах или лунках планшета (при вертикальной фотометрии). При этом для каждого объекта измерения определяется одно значение оптической плотности (один объект — одна цифра). Хотя этот подход адекватен для большинства биохимических тестов и для некоторых иммунологических реакций (например, иммуноферментный анализ в микропланшетах), существует множество диагности-

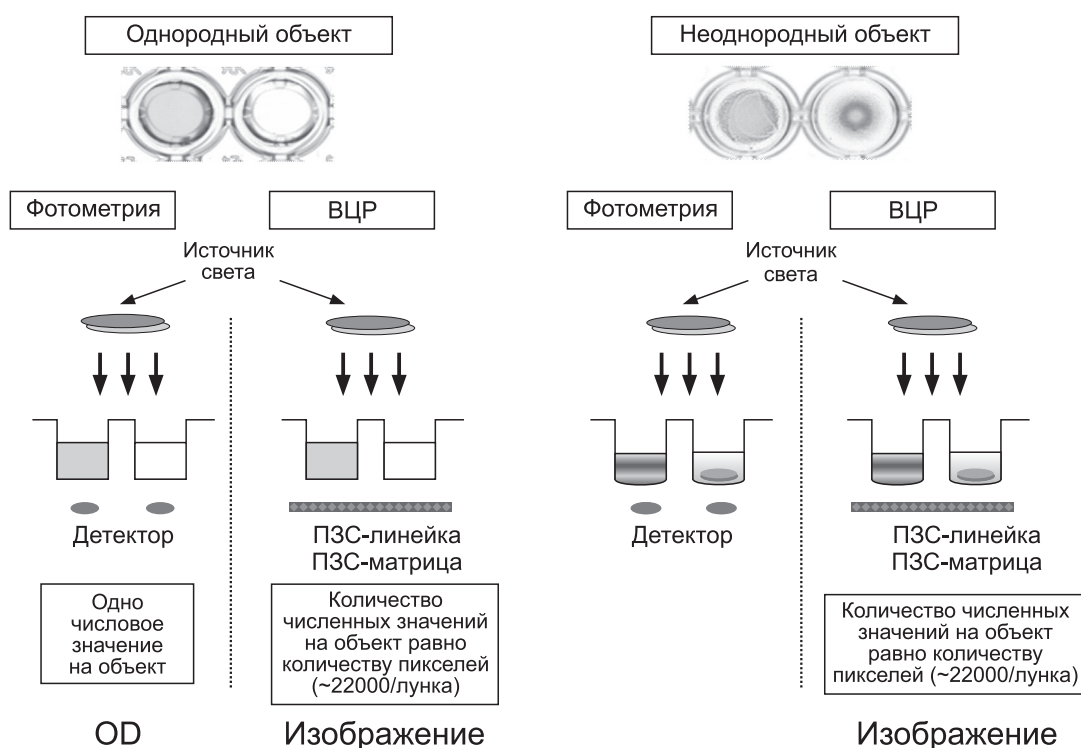


Рис. 1. Сопоставление возможностей технологии видеоцифровой регистрации с фотометрией для однородных и неоднородных лабораторных объектов

ческих методов иммунохимии, коллоидной химии, биохимии, изосерологии и др., где традиционная фотометрия не применима. Это лабораторные методы, где в результате реакции появляется градиент окрашивания, возникают полосы и пятна, изменяется структура объектов. Часто результаты подобных исследований учитываются визуально. Такие лабораторные исследования являются зоной, где подходы **ВЦР** особенно перспективны [2, 4].

На рисунке 1 представлена схема, иллюстрирующая возможности технологии видеоцифровой регистрации в сопоставлении с обычными фотометрическими методами.

Как это иллюстрирует рисунок 1, системы **ВЦР** дают возможность получать изображение образца, представляющее собой совокупность сигналов, отвечающих большому количеству точек выбранного объекта (например, лунки плашки или иммунохроматографической тест-полоски). Таким образом, при **ВЦР** на один объект приходится большое количество регистрируемых цифровых характеристик, которое определяется пространственным разрешением соответствующего устройства. В случае однородных объектов при **ВЦР** эти характеристики усредняются, то есть вычисляется среднее значение оптической плотности или коэффициента светоотражения для каждой точки объекта (обычно берется не менее 1 тысячи точек), что позволяет уменьшить погрешность измерения из-за возможных случайных факторов при проведении исследования.

Для неоднородных объектов наличие большого объема цифровой информации позволяет охарактеризовать выявленную дисперсию с последующим представлением результатов в зависимости от поставленных задач. Возможность анализа неоднородности объекта позволяет либо установить наличие артефактов в изучаемом однородном образце и исключить их влияние, либо, если неоднородность присуща объекту исследования и несет аналитическую информацию, получить ее аналитические характеристики, выраженные в численном виде.

Технологии лабораторных исследований часто используют объекты, представляющие собой совокупность аналитических элементов, отвечающих единичным образцам. Самым распространенным вариантом таких объектов является 96-луночный планшет, где конкретным образцам соответствуют индивидуальные лунки. Такими же единичными аналитическими элементами являются окрашенные пятна при проведении дот-исследований, элементы матрицы в матричных (чип, «агтау») технологиях, отдельные полосы на иммунохроматографических слайдах [7, 9].

Изображение макрообъекта, состоящего из совокупности отдельных элементов, программными методами можно разбить на отдельные так называемые «зоны интереса», соответствующие единичному элементу, и

обрабатывать информацию индивидуально по каждому из них. То есть при использовании такого принципа построения программного обеспечения видеоцифровая система является многоканальной с произвольным количеством каналов.

Программная компьютерная обработка информации позволяет определить параметры одной или нескольких «зон интереса», работать с изображением объекта в каждой из зон интереса индивидуально (контрастировать, увеличивать и сравнивать отдельные области), получать количественную или графическую оценку результата анализа, сохранять изображение и данные исследования. Так как сохраняется первичное изображение макрообъекта, при необходимости можно проводить требуемые дополнительные операции с любой из зон интереса без повторного считывания результатов, а также исключить из этой зоны дефекты изображения и артефакты (например, пыль, пузырьки воздуха).

Хотелось бы подчеркнуть, что сохранение первичного изображения, фиксирующего полную информацию об объекте, имеет самостоятельную ценность. Такое документирование и сохранение результатов обеспечивает опцию полного ретроспективного контроля выполненного исследования, что повышает ответственность персонала и позволяет снизить вероятность ошибок, связанных с «человеческим фактором». Возможность возвращаться к исходному изображению через некоторое время, объективно интерпретировать полученные результаты, отслеживать динамику изменения исследуемых параметров и консультироваться в случае неоднозначных результатов особенно важна для исследований, которые обычно проводятся с визуальной регистрацией (например, латекс-агглютинационные тесты), тем более что многие такие лабораторные тесты требуют регистрации в строго определенном временном интервале после начала соответствующей реакции. Немаловажное значение имеет и возможность передачи первичной информации по Интернету, в том числе и при проведении анализов у постели больного и в полевых условиях, когда в неясных случаях по первичному изображению соответствующими специалистами выносятся компетентное заключение.

2. Устройства получения изображения аналитических объектов

При выборе типа регистрирующего устройства для получения изображения аналитических объектов можно рассматривать два варианта. Это сканеры и видеоцифровые камеры. И сканеры и видеоцифровые камеры относятся к системам с применением так называемых ПЗС-устройств (ПЗС — прибор с зарядовой связью, что эквивалентно английской аббревиатуре «CCD» — «charge-coupled device»). В сканерах в качестве светочувствительного элемента применяются ПЗС (CCD)-линейки, а в видеокамерах используются ПЗС-матрицы.

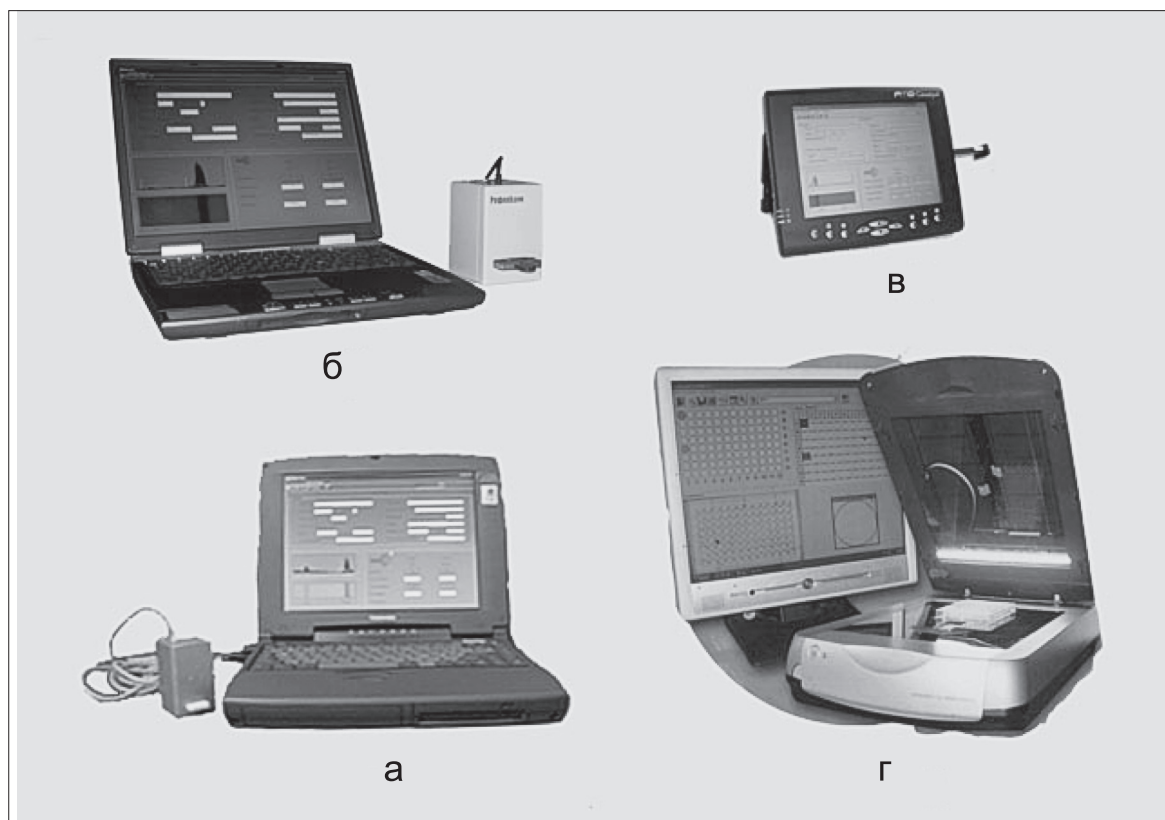


Рис. 2. Модификации регистрирующих видеоцифровых устройств на основе цифрового сканера и камеры:
(а) — регистрирующая аппаратура на основе цифровой камеры «Рефлеком-Мини»;
(б) — анализатор «Рефлеком» с компьютером «ноутбук»; (в) — «Рефлеком-компакт» (моноблок)
(г) система «Эксперт-Лаб» на основе сканера

ПЗС-устройства позволяют накапливать, хранить и передавать на компьютер изображение объекта с высоким разрешением.

На рисунке 2 показаны система «Эксперт-Лаб» на основе фотосканера (г) и несколько модификаций видеоцифровых систем «Рефлеком» на основе видеокамер (а, б, в). Каждое из регистрирующих устройств имеет свои достоинства и недостатки, поэтому в зависимости от поставленных задач клинической лабораторной диагностики могут применяться те или иные системы [2].

Сканеры производятся в массовом количестве, доступны по ценам, дают изображения высокого разрешения, обладают хорошей цветопередачей, однако они, в основном, приспособлены для работы с плоскими объектами. Из-за своих размеров и требований к электропитанию они используются, в основном, только как стационарное оборудование. Еще одним недостатком сканеров является необходимость непосредственного контакта объекта с поверхностью сканирующего устройства, что нежелательно при работе с объектами, на которые наносились анализируемые потенциально инфекционно-опасные биологические жидкости. Кроме того, время получения изображения сканером, определяемое скоростью перемещения каретки, составляет несколько десятков секунд, что ограничивает применение

сканера для исследований в режиме кинетических измерений.

Существенным достоинством системы «Эксперт-Лаб» является возможность работы с чрезвычайно распространенными лабораторными тестами, проводимыми в 96-луночных планшетах, изображения которых можно получать в режиме пропускания, а затем вычислять аналитические параметры, относящиеся к каждой из 96 лунок планшета.

ПЗС-камеры компактны, позволяют получать изображения хотя и с меньшим, но достаточным разрешением, обеспечивают более высокую скорость съемки, дают возможность конструировать малогабаритные мобильные и более универсальные, чем сканеры, приборы. Сейчас появились видеокамеры на КМОП (комплементарная металл-оксид-полупроводник структура, английский эквивалент CMOS — Complementary Metal-Oxide-Semiconductor) матрицах. Технология CMOS позволяет интегрировать на матрице, кроме светочувствительной области, различные устройства обработки информации и обеспечивает выпуск значительно более дешевых и более доступных видеокамер.

На рисунке 2 (а, б, в) показаны несколько вариантов системы «Рефлеком» («Синтэко-Комплекс», Россия). Обычная система «Рефлеком» (б) позволяет регистри-



Рис. 3. Рабочее окно программы «Эксперт-Лаб-РПГА»

ровать результаты иммунохроматографических тестов, матричных дот-тестов в формате 5×6 в режиме отражения и тестов в формате 3×4 в режиме пропуска. Решенная в виде моноблока с мини-компьютером компактная система «Рефлеком-Компакт» (в) и вариант «Рефлеком-Мини» (а), который с наладонным компьютером помещается в кармане, предназначены для работы в полевых условиях с иммунохроматографическими тестами. Все системы «Рефлеком» не нуждаются в подключении к электрической сети и в автономном режиме могут питаться от батареи компьютера. К недостаткам систем с видеокамерами относятся: небольшое поле зрения при сохранении компактных размеров устройств, трудности при создании равномерного освещения исследуемого объекта, сложности при регистрации светопропускания. Это ограничивает применение систем на основе видеокамер относительно небольшими по размеру объектами.

Важным свойством систем **ВЦР** является единообразие построения пользовательских интерфейсов и алгоритмов обработки информации, которые не зависят от типа устройства. На основе единых принципов построения программного обеспечения, используя алгоритмы обработки информации в соответствии с характеристиками конечных результатов для конкретных типов реакций, на базе видеодигитровых систем с различными программами удастся создать multifunctional устройства, способные обеспечивать достоверную и объективную регистрацию результатов различных лабораторных исследований.

3. ВЦР для регистрации результатов иммунохимических исследований в матричных форматах

Формат 96-луночного микропланшета. Как это было описано ранее, на основе разработанного нами сканерного аппаратно-программного комплекса «Эксперт-Лаб» можно регистрировать результаты различных иммунохимических исследований, проводимых в формате 96-луночного планшета, таких как иммуноферментный анализ — ИФА [10], реакция пассивной гемагглютинации — РПГА [9]; реакция латекс-агглютинации в крышках планшетов [3], изосерологические определения. Все описанные определения проводятся с получением изображения объектов в режиме проходящего света с последующим расчетом оптической плотности (для варианта ИФА) или попиксельным анализом полученных изображений агглютинационных реакций для автоматической дискриминации результатов.

Пользовательские интерфейсы и система представления информации всех программ, относящихся к матричным объектам, построены по единому принципу, который проиллюстрирован на примере окна программы для регистрации результатов РПГА (рис. 3).

В нижнем левом углу компьютерного окна представлено сохраняемое первичное изображение результатов реакции, зафиксированное в строго заданный методикой момент времени. Интерфейс предполагает заполнение протокола для каждой серии исследований и для каждого отдельного теста: задается расположение исследуемых образцов, контролей и калибраторов. В левой

верхней части экрана отображены данные автоматической интерпретации результатов.

Справа внизу иллюстрируется опция «лупа»: изображение любой лунки может быть увеличено, что позволяет более точно оценивать результат реакции. При необходимости можно одновременно вывести на экран увеличенное изображение нескольких проб (положительный и отрицательный контроль). Численная характеристика агглютинации также выводится на экран (справа вверху), обеспечивая дополнительной информацией для принятия верного решения.

Созданное программное обеспечение предусматривает интеграцию в лабораторную информационную систему, что может значительно снижать количество ошибок, связанных с неправильной идентификацией образца при выдаче результата.

Для каждого конкретного типа иммунохимической реакции были разработаны специальные алгоритмы автоматической интерпретации результатов.

В случае реакции латексной агглютинации, например, полученное на сканере и сохраняемое первичное изображение обрабатывается для усиления контраста и выявления характерной зернистой структуры в «зонах интереса». Далее путем ряда преобразований получается бинарное изображение, которое содержит уже только отдельные контрастные элементы, локализация которых соответствует зернам на исходном снимке. Для цифровой оценки выраженности агглютинации учитываются количество этих элементов в анализируемой зоне, их площадь и усредненная яркость.

Для оценки выраженности реакции РПГА также применяются операции повышения контраста, бинаризации и сегментации изображения, с последующим

выделением самого большого контрастного объекта, для которого определяют размеры и среднюю характеристику яркости. На основании комбинации этих данных делается заключение об интенсивности прохождения РПГА.

В случае иммуноферментных исследований в сканере при получении изображения используется источник «белого» света, причем сигнал регистрируется тремя светочувствительными элементами, каждый из которых работает в своем, довольно широком, цветовом диапазоне. Для получения на сканере результатов, эквивалентных данным традиционных спектральных приборов, где сигналы для выбранных длин волн регистрируются с помощью узкополосных светофильтров, для каждого субстрата подбираются специальные комбинации трех цветовых сигналов, реализующие соответствующий ему «программный цифровой фильтр». Помимо этого, при применении сканера с помощью специальных расчетов возможно автоматически выявлять лунки, имеющие неоднородную окраску. Эта опция принципиально нереализуема при регистрации результатов иммуноферментных исследований на обычных вертикальных фотометрах.

Миниатюризированные форматы (3×4, 5×6). Применение ВЦР с учетом возможностей цифровых устройств позволяет усовершенствовать проведение некоторых типов исследований путем миниатюризации, то есть уменьшения геометрических размеров объекта и сокращения требуемых для проведения реакции объемов реагентов и образцов без ущерба для аналитических характеристик систем.

Первый пример миниатюризированного формата — специально разработанные нами микропланшеты

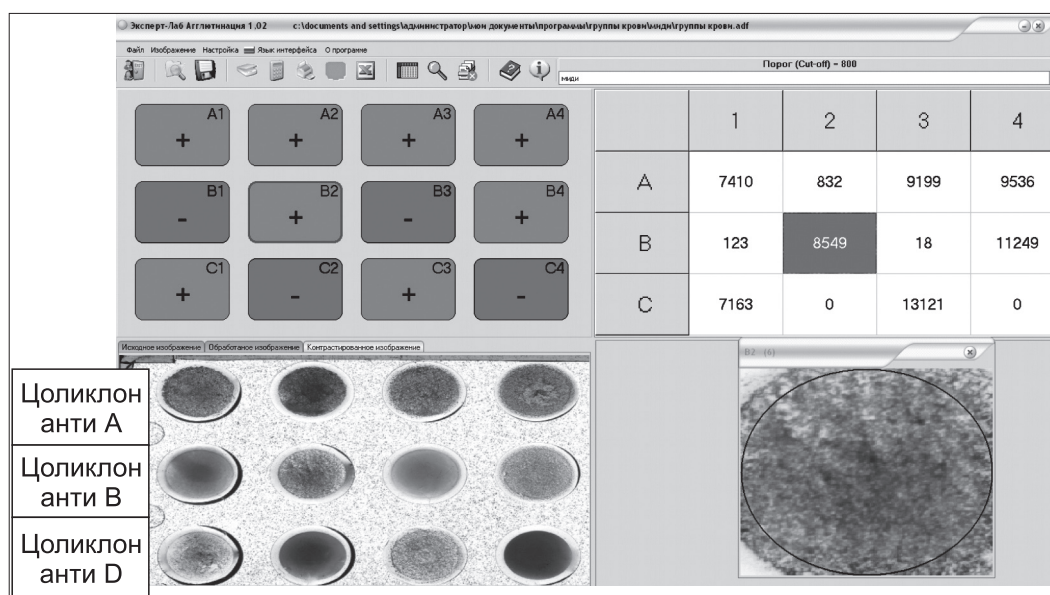


Рис. 4. Результаты проведения определения групп крови по системе АВ0 и Rh с помощью цоликлонов на носителе формата 3×4

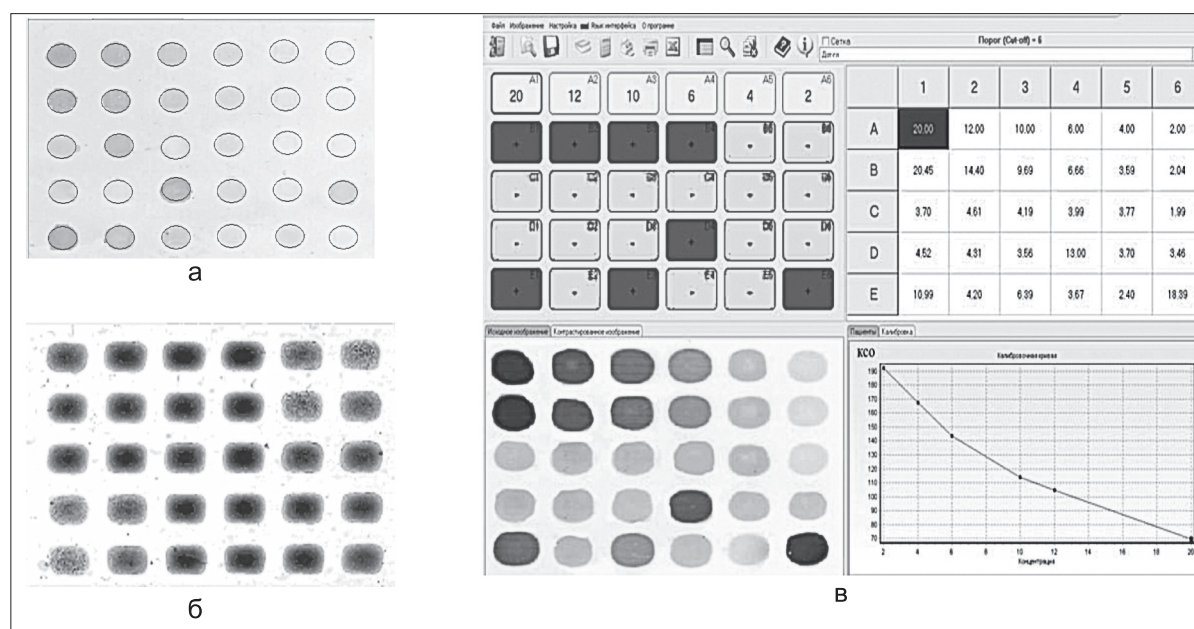


Рис. 5. Матрицы точек с результатами исследований на носителе 5×6:

(а) — результаты цветной реакции на мембране при определении концентрации альбумина в моче методом иммунодот-анализа (субстрат диаминобензидин); (б) — определение СРБ в сыворотке методом латексной агглютинации; (в) — окно разработанной программы «Эксперт-Лаб Видеодот» с определением концентраций глюкозы глюкозоксидазным методом по заданной калибровочной кривой

формата 3×4, сохраняющие дистанции между лунками, аналогичные 96-луночному планшету, но имеющие глубину лунки, оптимальную для получения изображения в режиме пропуска на сканере («Синтэко-Комплекс», Россия). Рабочий объем лунок микропланшета формата 3×4 составляет 10–20 мкл (для 96-луночного планшета — обычно 100–200 мкл). Использование микропланшетов позволяет уменьшить объем реагентов и проб с 20–50 мкл до 2–3 мкл при проведении агглютинационных реакций. В качестве примера на рисунке 4 приведены результаты изосерологических исследований на носителе формата 3×4. По 10 мкл цоликлонов и 5% суспензии эритроцитов смешивали в лунках микропланшета и через 3–5 минут фиксировали результат реакции агглютинации.

Дальнейшее снижение объемов реакционных смесей требует разработки соответствующих систем дозирования и регистрации, поскольку используемые в рутинной лабораторной практике дозирующие устройства и традиционная фотометрия, не говоря уже о «визуальном учете» результатов, в этих случаях не пригодны.

Для проведения исследований в таких объемах нами была разработана полная аналитическая платформа, включающая в себя систему позиционирования-смешивания, которая состоит из аппликаторов для реагентов и образцов, соответствующих им микропланшетов и позиционера, обеспечивающего фиксированное положение микропланшетов и носителя, и видеоцифровые регистрирующие устройства («Эксперт-Лаб» или «Реф-

леком») с соответствующим программным обеспечением. При использовании данной платформы после проведения аналитических реакций формируются матрицы точек формата 5×6, каждая из которых соответствует отдельной пробе, далее производится компьютерная обработка результатов по заданным алгоритмам.

Этот подход позволяет еще более снизить рабочий объем реакционной смеси до 1 мкл. Система позиционирования-смешивания, подробно описанная в других работах [1, 12], позволяет наносить упорядоченные матрицы микрокапель образцов объемом 0,3–0,5 мкл на нитроцеллюлозные мембраны при иммунодот-анализе или на реагентные мембраны полосок «сухой химии» для биохимических исследований. Также возможен вариант смешивания микрокапель образцов и реагентов в каждой точке матрицы на стекле при проведении реакций латекс-агглютинации [12] и при изосерологических исследованиях [6].

В подобном миниатюризированном формате с применением систем ВЦР могут быть проведены различные биохимические и иммунохимические исследования [5]. На рисунке 5 показаны матрицы результатов реакций при определении микроальбумина иммуноферментным методом (иммунодот-анализ) с субстратом диаминобензидином на нитроцеллюлозной мембране (а), СРБ методом латексной агглютинации (б) и окно программы для обработки результатов в формате 5×6 на примере определения глюкозы глюкозоксидазным методом на специализированной мембране (в).

Данные исследований по сопоставлению результатов, полученных в миниатюризованных форматах, с результатами референсных методов, подробно представленные в других публикациях [5, 6, 12], показали, что эти методы, несмотря на многократное снижение количества требуемых для проведения анализа реагентов, не уступают по аналитическим характеристикам макроскопическим методам.

4. ВЦР для регистрации результатов иммунохроматографических экспресс-тестов

В настоящее время одним из важных направлений развития иммуноанализа стали экспрессные иммунохроматографические тесты (ИХ-тесты), основанные на принципах иммунохроматографии с использованием в качестве меток частиц коллоидного золота. Основные преимущества этих методов — простота выполнения анализа, быстрое получение результата, надежность определений, не требующих высокой квалификации оператора.

Номенклатура доступных ИХ-тестов постоянно расширяется и почти полностью совпадает со спектром распространенных иммуноферментных определений.

Но иммунохроматография как лабораторный метод обладает такими серьезными недостатками как субъективность оценки результатов при визуальном учете, отсутствие возможности сохранения первичных документов. Результатом анализа, попадающим из лаборатории к лечащему врачу, является бланк с отметкой о положительных или отрицательных результатах теста.

Предложения сохранять саму полоску или кассету после проведения анализа с целью документирования или обсуждения результата не выдерживают критики, так как для большинства тестов рекомендуется фиксировать результат через определенное время после нанесения образца (обычно не позднее 10–15 мин с момента нанесения образца). Практически невозможно получение количественных результатов.

Решение этих проблем возможно при применении ВЦР. В качестве регистрирующих систем для ИХ-тестов может использоваться любая из описанных выше ВЦР-систем.

Как объект анализа ИХ-тест принципиально отличается от объектов матричного типа. В результате исследования на аналитической зоне тестовой полоски предусмотрено появление двух или нескольких линий — контрольной, обозначающей пригодность теста, и тестовых, обозначающих результаты анализа. Таким образом, для ИХ-тестов при ВЦР в «зонах интереса» рассчитывается интегральная интенсивность линий, а не исследуются изменения характеристик точек матрицы, как в вариантах дот-анализа.

С учетом особенностей иммунохроматографического экспресс-анализа было разработано программное обеспечение «Видеотест», элементы настройки и рабочее окно которого показаны на рисунке 6.

Рамкой на изображении выделяется аналитическая зона, изображение которой представляется в рабочем окне и конечной распечатке результатов. После определения границ диагностических линий, которое может проводиться в ручном или автоматическом режиме,

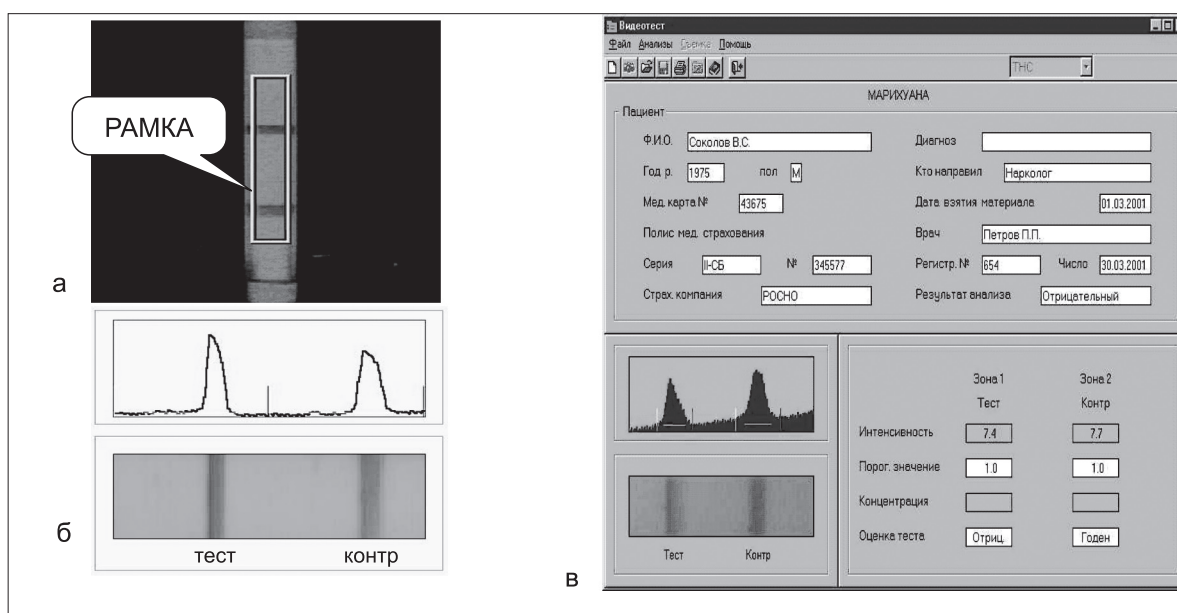


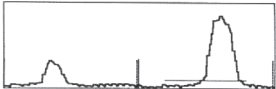
Рис. 6. Фрагменты окон настройки и основное окно программы «Видеотест»:

(а) — выделение рамкой аналитического поля тест-полоски в окне настройки программы; (б) — аналитическое поле тест-полоски с тестовой и контрольной линиями и денситограммы интенсивности сигнала в них; (в) — основное рабочее окно программы

Медсанчасть № 2

Простат специфический антиген

Ф.И.О. Владимиров А.И.	Диагноз аденома
Год р. 1938 пол м	Кто направил уролог
Мед. карта № 458	Дата взятия материала 29.09.03
Полис мед. страхования	Врач Мишин И.Л.
Серия XX-01 № 495876	Регистр. № 22 Число 29.09.03
Страх. компания МАКС	Результат анализа положительный




Тест
Контр

	Зона 1 Тест	Зона 2 Контр
Интенсивность	2.7	9.1
Порог. значение	0.6	1.0
Концентрация		
Оценка теста	Полож.	Годен

Подпись врача

Рис. 7. Представление результатов определения общего ПСА иммунохроматографическим методом с видеоцифровой регистрацией результатов на анализаторе «Рефлеком»

проводится расчет интегральной интенсивности окрашивания линий, используемой во всех дальнейших вычислениях.

Численное значение интенсивности линий в условных единицах представляется в окне результатов. В настроечном окне можно также установить пороговые значения для автоматического определения положительных или отрицательных результатов теста, или достаточной интенсивности контрольной полосы для подтверждения пригодности теста.

Как уже отмечалось, тесты могут выпускаться как в кассетном виде, так и в виде полосок, причем у разных производителей различаются размеры кассет, расположение тестовой и контрольной полос, ширина полосок. Возможность настройки программного обеспечения и анализатора на геометрические характеристики тестов конкретного производителя делает систему универсальной и применимой для любых выпускаемых ИХ-тестов. Обычно эти данные сохраняются для больших партий тестов, поэтому рутинная работа оператора предельно проста [2, 8].

Численные значения интенсивности также могут быть использованы для полуколичественного и количественного определения выявляемых аналитов. Для этого используется вариант с калибровочной кривой, которая вводится в специальном окне программы.

Результаты теста распечатываются в виде регистрационной формы, на которой фиксируются результаты теста в виде изображения аналитического поля полоски,

гистограмм интенсивности соответствующих полос и в числовой форме (рис. 7).

Разработанное программное обеспечение «Видеотест» в применении с любой системой ВЦР позволяет документировать, количественно обрабатывать и получать полуколичественные и количественные данные ИХ-тестов в различных форматах, с разными количествами зон, в кассетах разной формы, а также бескассетных тестов.

Использование видеоцифровой регистрации значительно повышает диагностическую ценность ИХ-тестов и поднимает иммунохроматографию на уровень полноценной лабораторной технологии.

В сжатом виде спектр применений разработанных ВЦР для задач клинической лабораторной диагностики систем суммирован в таблице 1.

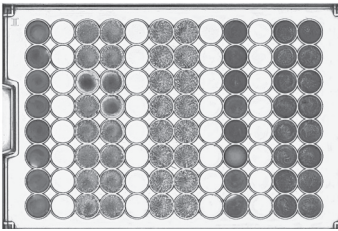
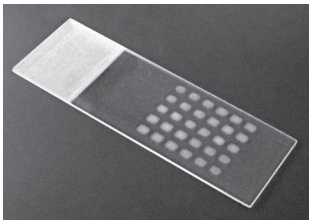
Следует отметить, что предлагаемые подходы к разработке систем ВЦР, принципам построения программного обеспечения, использования матричных форматов являются весьма гибкими и применимы практически ко всем задачам лабораторной диагностики.

В таблице 2 приведены сведения о некоторых дальнейших перспективных направлениях развития этих подходов.

Применение новой аналитической технологии — видеоцифровой регистрации — предоставляет специалистам по клинической лабораторной диагностике новые возможности совершенствования качества лабораторного обследования.

Таблица 1

Видеоцифровые системы и лабораторные исследования, проводимые с их использованием

Тип регистрирующего видеоцифрового устройства		Сканерная система «Эксперт-Лаб» 	Анализатор «Рефлеком» на основе видеокамеры 
Матричные форматы	Формат объекта	Виды лабораторных исследований	
	96-луночный планшет  рабочий объем 100 мкл	Иммуноферментный анализ	
		Латекс-агглютинационные тесты	
		Реакция пассивной гемагглютинации	
		Реакция агглютинации желатиновых частиц	
		Изосерологические исследования	
	12-ти луночный микропланшет (формат 3×4)  рабочий объем 10 мкл	Латекс-агглютинационные тесты	
		Изосерологические исследования	
		Латекс-агглютинационные тесты	
		Изосерологические исследования	
		Дот-анализ на мембранах (биохимические и иммунохимические исследования)	
	Миди-чип — матрица (формат 5×6)  рабочий объем — 1 мкл		
	Иммунохроматографические тесты 	Быстрые тесты для определения различных аналитов в сыворотке и моче (ПСА, ХГЧ, HBsAg, наркотики и т. д.)	

Перспективные направления развития клинических лабораторных исследований с видеоцифровой регистрацией

Сканерная система «Эксперт-Лаб»	Анализатор «Рефлексом» на основе видеокамеры
Иммунотурбидиметрические тесты в формате 96-луночного планшета	Тесты «сухой химии» по конечной точке и кинетика
Биохимические колориметрические исследования в формате 96-луночного планшета	Кинетические исследования в различных форматах
Микробиологические исследования (идентификация микроорганизмов и определение антибиотикочувствительности)	
Использование систем ВЦР для передачи цифровой информации лабораторных тестов через Интернет, в том числе по мобильной телефонной связи: — для организации профильных лабораторных сетей с вертикально интегрированной системой контроля качества; — для передачи информации и консультативной помощи из единого центра при полевых лабораторных исследованиях или тестах «у постели больного»	

Литература

- Венгеров, Ю.Ю. Способ проведения клинического и биохимического анализа биологических жидкостей / Ю.Ю. Венгеров [и др.] — Патент № 2005123717/15; заявл. 26.07.2005; опубл. 27.05.2008, бюл. № 15.
- Волощук, С.Г. Системы видеоцифрового анализа для лабораторной диагностики. Аппаратура и программное обеспечение / С.Г. Волощук [и др.] // Лабораторная медицина. — 2002. — № 5. — С. 82–87.
- Зайко, В.В. Система на основе сканера для документирования, объективизации и регистрации результатов тестов латексной агглютинации / В.В. Зайко [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2006. — № 12. — С. 18–21.
- Зайко, В.В. Системы регистрации и анализа изображений для задач клинической лабораторной диагностики / В.В. Зайко [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2005. — № 10. — С. 25–26.
- Зайко, В.В. Аналитические характеристики микроматрично-го полуколичественного метода проведения серийных латексных тестов с видеоцифровой регистрацией / В.В. Зайко [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2008. — № 6. — С. 17–20.
- Зайко, В.В. Биохимические и иммунохимические исследования в микроматричном формате на основе видеоцифровой регистрации: дисс. ... канд. биол. наук : 14.00.46 / В.В. Зайко; ФЦЭРМ. — СПб., 2008. — 117 с.
- Старовойтова, Т.А. Высокопроизводительные скрининг-методы на основе микро-дот анализа с видеоцифровой регистрацией / Т.А. Старовойтова [и др.]. // Клиническая лабораторная диагностика. — 1999. — № 10. — С. 16.
- Старовойтова, Т.А. Иммунохроматографический анализ простатического специфического антигена с видеоцифровой регистрацией / Т.А. Старовойтова [и др.] // Материалы научно-практической конференции и школы-семинара для молодых ученых с международным участием. Астрахань–Москва. — 2004. — С. 15–20.
- Старовойтова, Т.А. Видеоцифровой анализ для лабораторной диагностики: комплекс «Эксперт-Лаб» на основе сканера для документирования, объективизации и регистрации результатов латекс-агглютинационных, гемагглютинационных тестов, изосерологических и иммуноферментных исследований / Т.А. Старовойтова [и др.] // Лаборатория. — 2006. — № 1. — С. 19–22.
- Стериополо, Н.А. Применение сканера для регистрации результатов иммуноферментного анализа в стандартных микропланшетах / Н.А. Стериополо [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2006. — № 11. — С. 44–47.
- Папченко, А.А. Анализаторы и программное обеспечение для видеоцифровой регистрации результатов электрофоретических и иммуноферментных определений / А.А. Папченко [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 1999. — № 9. — С. 50.
- Zaiko, V. Microarray Method for Multiplex and Serial Latex Agglutination Tests with Digital Image Registration / V. Zaiko [et al.] // ClinLab. — 2008. — N 54. — P. 273–279.

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ЭКСПРЕСС-ЛАТЕКС-ТЕСТОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВИДЕОЦИФРОВОЙ РЕГИСТРАЦИИ

А.П. МАРТЫНКИНА¹, Т.А. СТАРОВОЙТОВА², Н.А. СТЕРИОПОЛО³, В.В. ЗАЙКО³,
В.А. КУТВИЦКИЙ⁴, А.Е. ТУГОЛУКОВ³, С.Г. ВОЛОШУК⁵, Ю.Ю. ВЕНГЕРОВ³

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

² НУЗ «ЦКБ № 1 ОАО «Российские Железные Дороги», Москва

³ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

⁴ Институт земного магнетизма, ионосферы и распространения радиоволн РАН
им. Н.В. Пушкова, Троицк

⁵ ООО «ОктаМедика», Москва

Резюме. Настоящая статья посвящена описанию применения и аналитическим характеристикам тестов латексной агглютинации на различных планарных носителях с использованием регистрации результатов реакций с помощью видеоцифровой системы «Эксперт-Лаб», в том числе для разработанных нами вариантов тестов в миниатюризированных форматах. Аппаратно-программный комплекс «Эксперт-Лаб» обеспечивает получение и сохранение первичного изображения тестов, высокую объективность оценки результата анализа за счет применения программных средств обработки изображения. Сохранение изображения в памяти компьютера позволяет ретроспективно корректировать возможные ошибки, а также более полно отслеживать динамику заболевания, сопоставляя результаты с данными ранее проведенных анализов. Применение комплекса «Эксперт-Лаб» позволило разработать миниатюризированные матричные системы, снижающие расход латексных реагентов более чем в 10 раз и увеличивающие производительность аналитического этапа работы. Сопоставление результатов, полученных разработанными системами с видеоцифровой регистрацией, с данными референсных методов продемонстрировало адекватность аналитических характеристик метода в миниатюризированных форматах.

Ключевые слова: видеоцифровая регистрация, латексная агглютинация, программное обеспечение, миниатюризация, мультианализ.

INFORMATIVENESS OF EXPRESS-LATEX-TESTS AT THE USE OF VIDEODIGITAL REGISTRATION

L.P. MARTYNKINA¹, T.A. STAROVOITOVA², N.A. STERIOPOLO³, V.V. ZAIKO³,
V.A. KUTVITSKY⁴, A.E. TUGOLUKOV³, S.G. VOLOSHCHUK⁵, YU.YU. VENGEROV³

¹ V.A. Engelhardt Institute of molecular biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

² NUZ TSKB N 1 ОАО «Rossijskiye zheleznyye dorogi», Moscow

³ A.N. Bach Institute of biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

⁴ N.V. Pushkov Institute of terrestrial magnetism, ionosphere and radiowave propagation,
Russian Academy of Sciences, Troitsk

⁵ «OctaMedica» LTD, Moscow

Summary. The use and analytical characteristics of latex agglutination tests performed on different planar carriers with the help of result registration by "Expert-Lab" videodigital system are described, including application to the developed tests in the regular microarray mode. "Expert-Lab" system provides obtaining and saving of primary image of the test results, high objectivity of the result evaluation due to the use of software for the image processing. Storage of the image in the electronic form in the data base allows the retrospective correction of possible mistakes and allows to follow the disease dynamics by comparison of the current results with the earlier made analyses. Application of "Expert-Lab" system allowed to develop microarray matrix systems using 10 times less of the latex reagent per analysis and to increase the productivity of the analytical procedure. Comparison of the results, obtained by the developed systems with the videodigital registration with ones obtained by reference methods demonstrated adequate analytical characteristics of the tests in the microformat.

Key words: videodigital registration, latex agglutination, software, microarray, multianalysis.

Введение

Диагностические системы на основе латексной агглютинации (ЛА) получили широкое распространение и

пользуются заслуженной популярностью благодаря скорости и удобству постановки реакции, возможности быстрого полуколичественного измерения исследуемых

компонентов. Метод прост и доступен для любых лабораторий. Однако у этих простых методов с традиционной визуальной регистрацией есть и существенный недостаток, а именно, неизбежная субъективность оценки результатов, усугубляемая требованием учета результатов в строго фиксированный промежуток времени.

Реакцию ЛА обычно проводят на плоских подложках различного типа, поэтому результаты этих реакций можно учитывать с помощью систем видеоцифровой регистрации (ВЦР).

Использование технологии ВЦР дает возможность в необходимый момент времени получить первичное изображение планарного носителя, на котором проводится реакция ЛА, а также решать задачи одновременного учета результатов во всех исследуемых образцах. Важно, что программные средства обработки изображения повышают объективность оценки результатов реакции ЛА. Сохранение изображения позволяет проводить ретроспективные консультации, корректировать возможные ошибки, а также более полно отслеживать динамику заболевания, возвращаясь и сопоставляя результат с данными ранее проведенных анализов. Таким образом, системы ВЦР, используемые для визуальных тестов ЛА, повышают качество и надежность оценки результатов.

Применение ВЦР для реакций ЛА также открывает возможности проведения этих реакций в миниатюризированных форматах, принципиально недоступных при использовании визуальной регистрации.

Настоящая статья посвящена описанию применения и аналитическим характеристикам тестов на основе реакции ЛА на различных планарных носителях с использованием ВЦР, в том числе для разработанных нами вариантов в миниатюризированных форматах.

Материалы и методы

Исследования проводили с использованием латексных реагентов производства «BioScience» и «Veda Lab» (Франция), «BioSystems» (Испания).

Для разработки технологии проведения реакции латексагглютинации в разных форматах с видеоцифровой регистрацией результатов и сравнительного исследования сопоставимости результатов различными методами были отобраны 833 образца сыворотки крови с известным содержанием анализатов: 355 образцов использовано для определения СРБ, 298 образцов — для определения РФ, 180 образцов — для определения АСЛО. Для определения аналитических характеристик методов использовали промышленные сывороточные контрольные аттестованные образцы фирмы «Randox» (Великобритания).

Изучали три варианта постановки реакции с ВЦР: 1) образцы по 10 мкл тщательно перемешивали с равным объемом латексной суспензии в лунках крышки 96-луночного микропланшета и после двухминутного кругового покачивания крышки в течение третьей минуты

наблюдали отсутствие или появление агглютинации (макрометод); 2) по 3 мкл образцов сыворотки и латексного реагента перемешивали в лунках специальных микропланшетов («Синтэко-Комплекс», Россия) и после покачивания фиксировали результат (в дальнейшем — метод в формате 3×4); 3) по 0,5 мкл образцов и латексного реагента наносили на предметное стекло с помощью системы позиционирования-смешивания («Синтэко-Комплекс», Россия), как это описано в [3, 7] (в дальнейшем — микрометод).

Наличие или отсутствие агглютинации оценивалось визуально (в макрометоде) и инструментально (во всех трех вариантах) с помощью аппаратно-программного комплекса «Эксперт-Лаб», состоящего из сканера Epson Perfection-4990 Photo (фирма «Epson», Япония), персонального компьютера и разработанного нами программного обеспечения «Эксперт-Лаб Агглютинация». Концентрация анализата в сыворотке определялась как самое большое разведение тестируемой сыворотки с положительной реакцией (титр сыворотки), умноженное на чувствительность реагента (6 мг/л — для СРБ, 8 МЕ/мл — для РФ при титровании, 200 МЕ/мл — для АСЛО).

В качестве референсных методов использовали:

- определение содержания анализатов СРБ, РФ, АСЛО в сыворотке крови иммунотурбидиметрическим методом на биохимическом автоматизированном анализаторе «AU 640» фирмы «Olympus Corporation» (Япония);
- определение титра анализатов СРБ, РФ, АСЛО в сыворотке крови методом ЛА на слайдах с применением диагностических наборов фирм «BioScience», «Veda Lab» (Франция) и «BioSystems» (Испания).

Статистическую обработку результатов проводили с учетом характера распределения и применением параметрических и непараметрических критериев. Для расчетов использовали компьютерную программу «STATISTICA-7 for WINDOWS».

Результаты и обсуждение

Для латексных тестов традиционно используется визуальная регистрация результатов реакции, что ведет к субъективной оценке результатов. Данный способ регистрации может приводить к ошибкам, особенно для проб, содержащих определяемое вещество в концентрациях, близких к порогу чувствительности метода. Вследствие особенностей образования комплексов «антиген-антитело» и вероятности развития неспецифической агглютинации в этих системах необходимо регистрировать результаты через строго определенное время (от 2–5 до 10–15 мин для разных тестов), что также отражается на ухудшении качества оценки выполнения анализа. Также при визуальной регистрации отсутствует документирование результатов анализа, что не позволяет в сомнительных случаях или в случаях, связан-

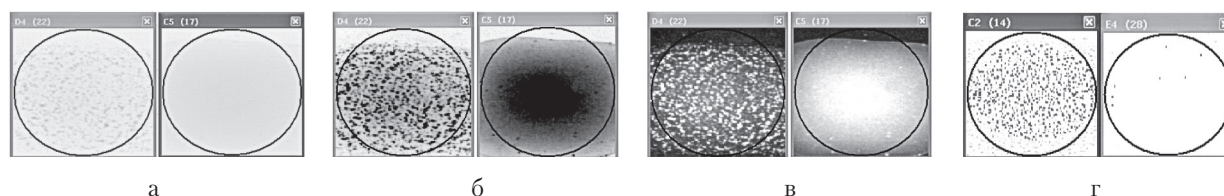


Рис. 1. Сравнение увеличенных изображений аналитических зон с наличием и отсутствием агглютинации в тестируемых сыворотках: первичное (а), контрастированное (б), инвертированное изображение (в) и визуальное аналоговое представление результатов математической обработки (г)

ных с необходимостью уточнения результатов из-за ошибок оператора, провести повторную оценку результатов постановки анализа.

Невозможность объективного учета результата реакции и сохранения его для последующих консультаций ограничивает ценность и сужает область применения латексных тестов.

Задачи документирования результатов латекс-агглютинационных тестов через строго определенное время и объективизации интерпретации результатов могут быть решены с привлечением ВЦР.

Фиксируемым визуально или с помощью приборов результатом реакции агглютинации является изменение структуры объекта. Так, при положительной реакции происходит переход от однородной субстанции (однородная мутная жидкость) к появлению зернистости или различных частиц комплексов в капле. Регистрирующий компонент видеоцифровой системы сканер «Epson Perfection-4990 Photo» позволяет получить изображение объекта с высокой степенью разрешения (4800 точек на дюйм). После сканирования и передачи изображения в компьютер специализированная программа анализа изображений («Эксперт-Лаб Агглютинация») обрабатывает сигналы именно от «зон интереса», соответствующих участкам носителя, отвечающим конкретным образцам. Алгоритм автоматической дискриминации (определения наличия или отсутствия агглютинации) разработан с учетом особенностей протекания реакции латексной агглютинации.

Программные средства обработки изображения позволяют заметно улучшить его качество, что дает возможность более объективно оценить наличие и степень агглютинации визуально на экране дисплея. С помощью программы можно увеличить и контрастировать изображение одной или сразу нескольких лунок планшета. В случае необходимости такое изображение можно инвертировать. На рисунке 1 представлены результаты обработки изображения программными средствами для визуального контроля результата анализа для каждого элемента матрицы индивидуально.

При сомнительной картине агглютинации увеличенные изображения аналитических зон с прореагировавшей тестируемой сывороткой можно сравнить с располагаемыми рядом на экране компьютера увеличенными изображениями аналитических зон с контрольными

образцами, чем достигается объективизация оценки результата реакции агглютинации.

Дополнительные возможности предоставляет математическая обработка изображения. Путем ряда преобразований получают бинарное изображение, которое содержит уже только отдельные контрастные элементы, локализация которых соответствует зернам на исходном снимке (рис. 1 г).

Принципы построения интерфейса более подробно описаны нами ранее [1, 4–6]. Программа позволяет работать с объектами различной величины, с различными форматами матрицы аналитических точек. На рисунке 2 в качестве примера приведено рабочее окно программы при исследовании на носителе формата 3×4. В окне программы представлены сохраняемое первичное изображение результатов реакции, зафиксированное в строго заданный методикой момент времени; расположение исследуемых и контрольных образцов, данные автоматической дискриминации результатов по пороговому значению (положительные и отрицательные пробы); численные данные математической обработки изображений анализируемых зон.

Сохранение изображения в цифровом формате обеспечивает ретроспективный контроль результатов, возможность консультаций, выявление ошибок, связанных с «человеческим фактором». Возможно также наблюдение за развитием агглютинации во времени (получение временных рядов изображений).

Для численной оценки выраженности агглютинации учитывалось количество элементов в каждой зоне, их площадь и усредненная яркость. Численное представление интенсивности агглютинации давало возможность получения количественной оценки результата реакции агглютинации и определения порогового значения для дискриминации положительных и отрицательных образцов. Пороговое значение может быть задано как неким фиксированным числом, так и формулой, включающей численные значения, соответствующие интенсивности агглютинации в зонах отрицательного и положительного контроля с выбираемыми оператором коэффициентами. Численная характеристика агглютинации обеспечивает дополнительную информацию для принятия верного решения.

Опция «Лупа» — увеличение изображения лунок — позволяет более точно оценивать результат реак-

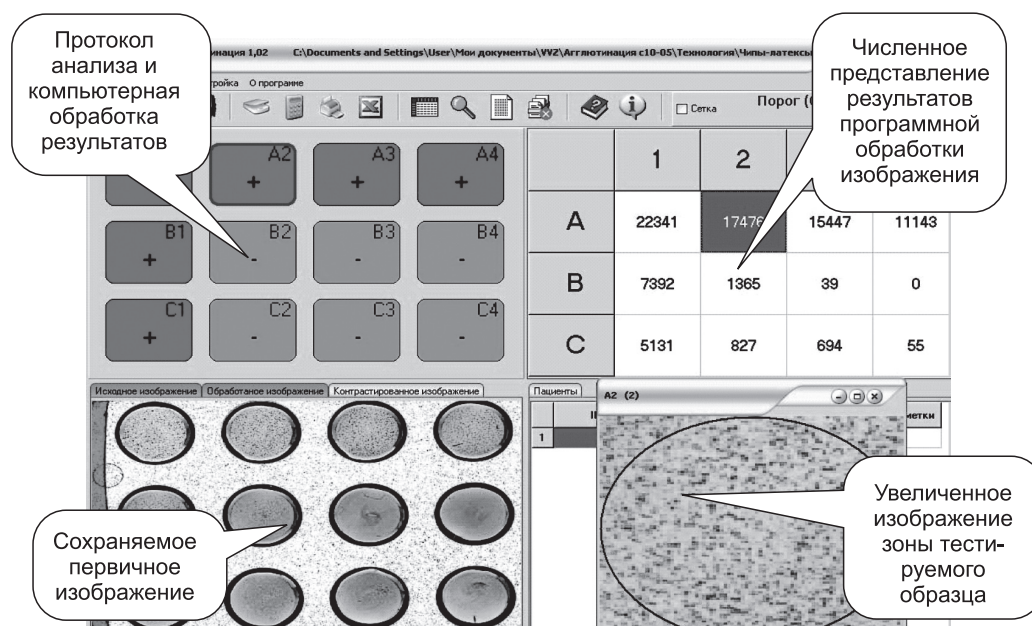


Рис. 2. Основное окно разработанной программы «Эксперт-Лаб Агглютинация»

ции. При необходимости можно одновременно вывести на экран увеличенное изображение нескольких проб.

Таким образом, информация о наличии или отсутствии агглютинации для конкретного образца с помощью предлагаемой системы видеорегистрации фиксируется и сопоставляется в различных видах. Такое дублирование информации значительно повышало достоверность результатов проводимых исследований, снижало влияние случайных и систематических ошибок на результат лабораторного теста.

Созданное программное обеспечение предусматривает интеграцию в лабораторную информационную систему, что значительно снижает количество ошибок, связанных с неправильной идентификацией образца при выдаче результата.

Возникающая в результате программной обработки изображения проводимого исследования численная характеристика — это объективный показатель, который может использоваться для характеристики образца. Наличие точных количественных данных, получаемых с помощью диагностического комплекса, позволяет с помощью математических методов охарактеризовать понятие «воспроизводимость тестирования» применительно к агглютинационным тестам и таким образом оценить степень разброса данных. Наличие цифровых данных о результатах агглютинационных тестов, получаемых с помощью системы ВЦР, позволило проводить внешний и внутренний контроль качества при выполнении этих широко распространенных методик, что невозможно при визуальном учете результатов.

Разработанные алгоритмы автоматической интерпретации результатов были опробованы на большом количестве клинического биологического материала.

В качестве модели для отработки методики было выбрано определение СРБ, РФ и АСЛО в реакции латексной агглютинации.

Реакцию в формате «макрометода» проводили в лунках крышки 96-луночных планшетов, внося по 10 мкл образцов и реактивов. Для автоматической дискриминации результатов пользовались фиксированным значением порогового значения. Так как, чтобы рассчитывать пороговое значение с учетом значений интенсивностей контролей, последние должны быть точно охарактеризованы (к сожалению, в инструкции к контрольным материалам часто указано лишь, что концентрация аналита в положительной сыворотке превышает пороговое значение). Метод расчета фиксированного значения порога использует усредненные численные значения интенсивности агглютинации в 20 отрицательных образцах и в 20 образцах с концентрацией аналита на уровне предела чувствительности латексного реагента (примеры расчета порогового значения при определении СРБ, РФ и АСЛО латексными реагентами «BioSystems» и «Veda Lab» показаны в табл. 1).

Результаты сопоставления визуальной и инструментальной оценки выраженности латекс-агглютинации в крышках (СРБ, РФ и АСЛО) для 488 исследованных образцов при скрининговом варианте проведения реакции ЛА представлены в табл. 2.

При сравнении результатов, интерпретируемых визуально и инструментально, обращает на себя внимание процент несовпадений. Анализ выявленных различий показал, что в большинстве случаев причиной послужила ошибка оператора: неправильная идентификация образца (в 27 случаях или 5,5 % всех определений) или нераспознанные мелкие агглютинаты (7 случаев или

Таблица 1

Параметры выбора порогового значения для СРБ, РФ и АСЛО для латексных диагностикумов «BioSystems» и «Veda Lab»

	СРБ BioSystems	СРБ VedaLab	РФ BioSystems	РФ VedaLab	АСЛО BioSystems
Котр ($\pm 3SD$)	503 $\pm$ 465	650 $\pm$ 594	577 $\pm$ 501	792 $\pm$ 753	451 $\pm$ 360
К min C аналита ($\pm 3SD$)	4367 $\pm$ 1862	4587 $\pm$ 1985	6112 $\pm$ 1691	4521 $\pm$ 1965	3321 $\pm$ 1201
Пороговое значение	2500	2500	4000	2500	2000

Таблица 2

Результаты определения СРБ, РФ и АСЛО с помощью системы «Эксперт-Лаб Агглютинация»

Исследуемый аналит	Регистрация результата	Всего	< 6 мг/л	> 6 мг/л	% несовпадений
СРБ	визуально	237	174	63	9,7
	ВЦР	237	193	44	
			< 20 МЕ/мл	> 20 МЕ/мл	
РФ	визуально	174	94	52	1,1
	ВЦР	174	95	51	
			< 200 МЕ/мл	> 200 МЕ/мл	
АСЛО	визуально	77	60	17	6,5
	ВЦР	77	61	16	

1,5%). Подобные ошибки в случае проведении тестирования по нашей методике могут быть исключены практически полностью.

Кроме того, применение видеоцифровых систем в массовых масштабах поможет стандартизировать критерии оценки положительных и отрицательных результатов анализа при скрининге, разработать подходы для ведения внутрилабораторного контроля качества для данного вида исследований, повысить эффективность обучения персонала. Так, при использовании системы «Эксперт-Лаб Агглютинация» в нашей лаборатории выяснилось, что разные лабранты по-разному интерпретируют агглютинацию в одной и той же лунке. После накопления в базе данных определенного количества изображений был проведен тренинг среднего персонала, и воспроизводимость результатов ЛА, регистрируемых визуально, возросла.

Еще одно преимущество применения ВЦР — это миниатюризация тест-систем с целью экономии реактивов и образцов и проведения мультианалитических исследований. Достаточно большое разрешение позволяет без труда зафиксировать наличие агглютинации в малых объектах.

Первый шаг был сделан при проведении реакции в лунках крышки микропланшета. При этом количество реагентов уменьшилось в 2–5 раз (10 мкл вместо 20–50 мкл).

Следующим этапом было дальнейшее уменьшение объемов: были разработаны специальные 12-луночные носители с объемом лунки не более 15 мкл, с форматом матрицы аналитических зон 3×4 с шагом, совпадающим с таковым стандартных микропланшетов. Для реакции ЛА в этих микропланшетах было достаточно всего по 3 мкл образца и реактива. Исследования, проводимые в микропланшетах такого формата, с одной стороны, не требуют дополнительных приспособлений, с другой, значительно экономят дорогостоящие реактивы (рис. 3а).

Дальнейшие разработки с использованием специального оборудования для проведения реакции агглютинации в микрообъемах позволили сократить расход реагентов до десятых долей микролитров. При помощи предложенного нами устройства — системы позиционирования-смешивания — стало возможным выполнение реакции на предметном стекле в 30 аналитических зонах матрицы формата 5×6 одновременно, причем объем реакционной смеси не превышает 1 мкл (рис. 3б).

В данном случае учет результатов реакции может быть выполнен только при помощи ВЦР, так как визуальная регистрация не применима [2, 3, 7].

Было проведено исследование по оценке аналитических характеристик разработанного метода определения СРБ, РФ и АСЛО на контрольных сыворотках

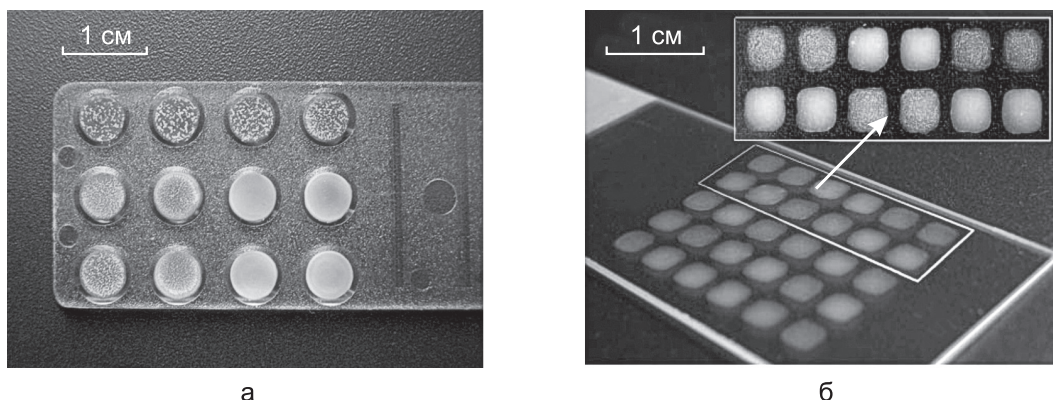


Рис. 3. Внешний вид носителей с проведенной на них реакцией латексной агглютинации:
(а) — 12-луночный микропланшет формата 3×4; (б) — увеличенное изображение предметного стекла

«Liquid assayed specific protein control» («Randox») трех уровней концентраций и клиническом материале. Воспроизводимость определяли по серийным разведениям контрольных сывороток. Коэффициент вариации для отрицательных сывороток с концентрацией аналита меньше минимально определяемой концентрации был равен 0. Данные по воспроизводимости результатов определений для контрольных сывороток представлены в таблице 3. Для расчета коэффициента вариации в случае макроварианта использовали численные значения интенсивности агглютинации, полученные в ходе программной обработки, в микроварианте вычисления производились, исходя из полученных титров сывороток.

Эти же контрольные сыворотки использовались и для расчета минимальной определяемой концентрации исследуемых веществ методом последовательных двукратных разведений ($n = 10$) (табл. 4).

Для оценки правильности разработанного метода было проведено исследование на клиническом матери-

але. 345 образцов сыворотки были проанализированы на наличие СРБ, РФ и АСЛО с помощью реакции ЛА обычным традиционным методом с визуальной регистрацией, его модификацией в крышках 96-луночных планшетов и микрометодом постановки в формате матрицы с ВЦР. В качестве референс-определения использовали измерение концентраций аналитов ревматоидной тройки иммунотурбидиметрическим методом на приборе «AU640» (фирма «Olympus», Япония).

При сравнении модифицированных нами методов проведения ЛА (в микроформате и макрометода в крышке планшета) с иммунотурбидиметрическим методом и визуальным полуколичественным методом на слайдах отмечалось хорошее совпадение результатов.

Данные статистической обработки методом корреляционного анализа, приведенные в таблице 5, выявили высокую степень совпадения результатов, полученных разными методами: микрометодом ЛА с видеорегистрацией, макрометодом с проведением анализа в крышке планшета, классическим полуколичественным методом

Таблица 3

Данные по воспроизводимости результатов определения аналитов в контрольных сыворотках «Randox»

Аналиты	Концентрация аналита в контрольных сыворотках	CV, % данные производителя латексных реагентов	CV,%, для турбидиметрических тестов	CV20, % для макрометода	CV20, % для микрометода
СРБ, мг/л	25,7 ± 3,9	25	43	16,9	10
	52,6 ± 7,9			12	5
	78,3 ± 11,7			13	5
РФ, МЕ/мл	40,3 ± 8,1	25	7,0	7,6	15
	56,3 ± 11,3			11,3	10
АСЛО, МЕ/мл	354 ± 45	20	6,3	15,1	15

Таблица 4

Аналитическая чувствительность метода ЛА с ВЦР, определенная методом последовательных двукратных разведений контрольных сывороток ($n = 10$)

	СРБ (мг/л)	РФ (МЕ/мл)	АСЛО (МЕ/мл)
«BioSystems» макрометод	$6,7 \pm 2,3$	$10,4 \pm 3,4$	268 ± 79
микрометод	$6,8 \pm 1,27$	$10,5 \pm 4,1$	234 ± 57
«VedaLab», макрометод	$7,6 \pm 3,3$	$15,4 \pm 6,6$	304 ± 73
Данные производителя	6–10	8–16	150–300

Таблица 5

Данные статистической обработки (коэффициенты корреляции Спирмана) результатов, полученных в системах с реакцией ЛА на планарных объектах и иммунотурбидиметрическим методом

Референс-методы Методы с ВЦР	Иммунотурбидиметрия			Классический метод ЛА с визуальной регистрацией		
	СРБ	РФ	АСЛО	СРБ	РФ	АСЛО
ЛА в лунках крышки планшета	0,978	0,930	0,951	1,0	0,988	0,988
Микроматричный метод	0,981	0,923	0,959	0,993	0,987	0,977
Классический метод ЛА с визуальной регистрацией	0,978	0,928	0,937	—	—	—

на слайдах с визуальной регистрацией, иммунотурбидиметрическим методом (коэффициенты корреляции Спирмана $> 0,9$).

Выводы

Аппаратно-программный комплекс «Эксперт-Лаб» является эффективным средством регистрации результатов реакции латексной агглютинации. С его помощью возможно получение и сохранение первичного изображения высокого качества и достижение высокой объективности оценки результата анализа за счет применения программных средств обработки изображения. Сохранение изображения в памяти компьютера позволяет не только накапливать результаты в базе данных, но и ретроспективно корректировать возможные ошибки, сопоставляя результат с данными ранее проведенных анализов. Применение комплекса «Эксперт-Лаб» позволило разработать миниатюризированные матричные системы, позволяющие более чем в 10 раз снизить расход латексных реагентов, увеличить производительность аналитического этапа работы с сохранением всех аналитических характеристик метода.

Литература

1. Зайко, В.В. Система на основе сканера для документирования, объективизации и регистрации результатов тестов латексной агглютинации / В.В. Зайко [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2006. — № 12. — С. 18–21.

2. Зайко, В.В. Мультиплексная аналитическая система для проведения тестов латексной агглютинации в микроформате с видеоцифровой регистрацией / В.В. Зайко [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2007. — № 9. — С. 39.

3. Зайко, В.В. Аналитические характеристики микроматричного полуколичественного метода проведения серийных латексных тестов с видеоцифровой регистрацией / В.В. Зайко [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2008. — № 6. — С. 17–20.

4. Старовойтова, Т.А. Видеоцифровой анализ для лабораторной диагностики: комплекс «Эксперт-Лаб» на основе сканера для документирования, объективизации и регистрации результатов латекс-агглютинационных, гемагглютинационных тестов, изосерологических и иммуноферментных исследований / Т.А. Старовойтова [и др.] // Лаборатория. — 2006. — № 1. — С. 19–22.

5. Старовойтова, Т.А. Видеоцифровой анализ для лабораторной диагностики: комплекс «Эксперт-Лаб» на основе сканера для документирования и регистрации результатов латекс-агглютинационных тестов и иммуноферментных исследований / Т.А. Старовойтова [и др.] // Тезисы докладов семинаров и конференций в рамках выставки «AnalyticaExpo-2006». — М., 2006. — С. 42–43.

6. Старовойтова, Т.А. Видеоцифровая система «Эксперт-Лаб» для регистрации и объективизации результатов латекс-агглютинационных тестов в формате 96-луночного планшета / Т.А. Старовойтова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2007. — № 9. — С. 37.

7. Zaiko, V. Microarray Method for Multiplex and Serial Latex Agglutination Tests with Digital Image Registration / V. Zaiko [et al.] // ClinLab. — 2008. — N 54. — P. 273–279.

ПАНДЕМИЯ ГРИППА H1N1 — ГОТОВЫ ЛИ МЫ К НЕЙ?

Б.Ф. ШУЛЯК, А.Н. РАДЧИКОВА

ООО «ГЕМ» (г. Москва)

Коротко о «свином» гриппе

Ортомиксовирусы (в т. ч. вирусы гриппа — ВГ) чрезвычайно склонны к генетической изменчивости, что определяет две их важнейшие молекулярно-биологические особенности. Первая заключается в высокой вариабельности поверхностных антигенов, играющих ключевую роль в инфекционном процессе: мутации затрагивают до 50% их аминокислотного состава. Другая особенность состоит во фрагментированности генома, который состоит из 8 сегментов РНК — ими при смешанной инфекции различные генотипы ВГ могут обмениваться, в результате чего появляются реассортанты.

Грипп свиней — острое высококонтагиозное респираторное заболевание, вызываемое типом А ВГ. В настоящее время по гемагглютинирующей способности различают 16, а по нейраминидазе 9 вариантов агента. Из них превалируют 3 основных подтипа — H1N1, H3N2 и H1N2 [Dee S.A. Respiratory Disease of Pigs. In: The Merck Veterinary Manual. 9th ed. Pennsylvania: National Publ Inc, 2005, 1228]. Смешанная инфекция ВГ человека, птиц и свиней служит почвой для появления новых антигенных реассортантов [Webster R., Cox N., Stohi K. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO, 2002, 15–67]. Сейчас большинство вирусологов пришли к консенсусу относительно того, что наиболее значимым естественным хозяином ВГ и важнейшим резервуаром и источником инфекции для людей служат мигрирующие водоплавающие птицы. Однако и свинья играет не последнюю роль в распространении и эволюции ВГ: она восприимчива не только к собственному ВГ, но также к ВГ птиц и человека, являясь, тем самым, своеобразным природным резервуаром, в котором происходит встреча различных вариантов ВГ и обмен между ними генетической информацией.

За обозримый период времени ВГ свиней вызывал крупные эпидемии, по всей видимости, трижды: в 1918 г. «испанку» — его подтип H1N1 унес жизни 20–40 млн человек в Европе, Америке и Азии; в 1998 г. по Северной Америке прокатилась инфекция подтипа H3N2, возникшего в результате встречи ВГ свиней и человека; и, наконец, «мексиканский» реассортант H1N1 2009 г., которому и посвящена настоящая статья. Он, как показало секвенирование его генома, является ВГ свиней, ставшим реципиентом фрагментов генома ВГ птиц и людей. Генетический анализ штаммов ВГ, выделенных от людей в периоды других эпидемий гриппа, когда регистрировали эту инфекцию и у свиней, свидетельствует о том, что они были реассортантами ВГ птиц и человека,

а свинья служила всего лишь случайной жертвой, к которой адаптировались новые варианты возбудителя.

Любая вспышка гриппа уникальна и развивается своим собственным путем. Поэтому нет стандартных путей борьбы с ними, и каждый раз необходим выбор особой стратегии контроля инфекции, основанной на знании биологических особенностей возбудителя, его патогенности и эпидемического потенциале. Попробуем с этих позиций проанализировать, насколько опасен грипп, начавшийся в апреле 2009 г. в столице Мексики.

Часто слабовирулентные штаммы ВГ охватывают миллионы людей, но не вызывают массовых случаев тяжелой болезни и смерти. С другой стороны, еще не забыт высокопатогенный грипп птиц, с панзоотией которого не удавалось справиться многие годы; он оказался опасным для людей, но не вызвал эпидемий. Широкое распространение реассортанта H1N1 2009 говорит о его потенциальном пандемийном характере. За период, прошедший с начала вспышки гриппа в Мексике, эту инфекцию диагностировали приблизительно у 30 тыс. человек почти в 80 странах. Последняя из упомянутых цифр весьма велика, но инцидентность инфекции в большинстве стран низка, и очень часто ее диагностируют у людей, побывавших за пределами своей родины, а не у больших групп местного населения. Смертность также невелика. К примеру, в первичном очаге инфекции — г. Мехико с 22-миллионным населением, умерло немногим более 100 чел. (всего в этой стране зарегистрировали за 5 мес., прошедших с начала пандемии, 193 случая летальной инфекции H1N1 2009). Смерть каждого человека — безвозвратная потеря, но не следует забывать о том, что масштабы ежегодного ущерба, наносимого банальными штаммами ВГ, ничуть не меньше. К примеру, в США каждую зиму гриппом заболевает до 200 000 чел., а умирает 36 000 [<http://www.cdc.gov/flu/about/disease/index.htm>]. По видимому, мексиканский вариант ВГ не способен к быстрому распространению среди населения (хотя сомневаться в его способности передаваться от человека к человеку и преодолевать государственные границы не приходится) и вызывает тяжелое заболевание далеко не во всех случаях. К нему наиболее восприимчивы молодые люди, что характерно для штаммов ВГ, вызывавших пандемии в прошлом. С тех пор, когда ВГ был впервые выделен в 1930-х годах, стало аксиомой, что тяжесть эпидемий этой инфекции зависит от относительного количества восприимчивых к инфекции людей в той или иной популяции. Последнее

определяется склонностью циркулирующих штаммов ВГ менять аминокислотный состав своих поверхностных белков — гемагглютинина (Н) и нейраминидазы (N). Чем значительнее такие изменения, тем меньше вероятность, что имеющиеся у населения антитела к ВГ окажутся способными нейтрализовать новый вариант возбудителя (т.е. тем ниже иммунитет популяции к инфекции). Основным компонентом ВГ, который определяет динамику эпидемий, считают расположенный на поверхности вириона гемагглютинин. Его свойствами определяется способность вирусных частиц прикрепляться к клеткам различных видов млекопитающих. Он несет эпитопы, индуцирующие образование у хозяина специфических антител, препятствующих прикреплению вируса к клеткам. Специалисты Walter Reed Army Hospital (г. Вашингтон, США) установили, что основные генетические изменения мексиканского варианта ВГ сконцентрированы в гене Н, но различия последнего у H1N1 2009 и возбудителя «испанки» составляют 18% [Gallagher W.R. Towards a sane and rational approach to management of Influenza H1N1 2009. Virol J., 2009, 6:51]. По гену нейраминидазы H1N1 2009 наиболее близок (94%-я идентичность) штамму ВГ подтипа H1N1, циркулировавшим в Европе в 1990-х годах, не вызывая тяжелых эпидемий. У H1N1 2009 в результате обмена генетическим материалом между ВГ свиньи, птиц и человека произошел значительный сдвиг поверхностных антигенов. В последний раз подобные изменения антигенов ВГ отметили у штамма Азия H2N2, появившегося в 1957 г. У реассортанта H1N1 2009 много компонентов, приобретенных у подтипов H2N2 и H3N2, циркулировавших среди животных в 1957 и 1968 гг. Это снижает эффективность его репликации в организме человека. Однако совершенно непредсказуемо, в каком направлении пойдет эволюция H1N1 2009. Не исключено, что в будущем он приобретет от других штаммов ВГ гены, которые позволят ему лучше адаптироваться к человеку, быстрее размножаться и распространяться среди населения, проявлять более высокую патогенность. Допускается также альтернативная возможность мутации его собственных генов, которая способна привести к тому же результату даже без генетических рекомбинаций.

Стратегия и тактика в условиях пандемии

Анализ событий говорит о том, что H1N1 2009 обладает умеренной вирулентностью для человека и медленно распространяется среди населения. Однако в результате эволюции возбудителя возможны расширение масштабов пандемии и повышение ее тяжести (как по заболеваемости и тяжести симптоматики, так и по смертности). Такую опасность нельзя исключить и надо быть к ней готовым на всех уровнях: в какой степени удастся избежать значительных человеческих и экономических потерь зависит не только от свойств возбудителя, но и от эффективности деятельности тех, кто всегда находит-

ся на переднем плане борьбы с инфекционными болезнями — врачей и лабораторных работников. Этой категории медицинских работников актуальность проблемы понятна, но как практически ее решить они знают далеко не всегда.

Отбор проб клинического и секционного материала образцов гриппа и обращение с ними, а также их хранение, упаковку и транспортировку осуществляют в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» и СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности». Возбудителя легче всего обнаружить в мазках, получаемых из носа, гортани, носоглотки и миндалин, а также носовом смыве и носоглоточном аспирате. Самостоятельное изготовление зондов-тампонов требует больших затрат времени и труда, а кроме того, они по всем параметрам уступают готовым аналогам. Готовые зонды-тампоны не только стерильны, но могут иметь не хлопковую, а вязкую или дакроновую головки, которые обеспечивают более эффективный сбор клеток и клеточного дебриса, чем жидкой части секретов, что крайне важно для вирусологических исследований.

Для получения мазка из носовой полости зонд-тампон с любой (деревянной, пластиковой или алюминиевой) насадкой вводят в ноздрю параллельно мягкому небу. Затем его поворачивают вокруг собственной оси. Мазок из носоглотки делают зондами-тампонами с гибким (пластиковым или металлическим) стержнем тем же способом. Для получения мазка с миндалин это приспособление вводят через ротовую полость, придерживая язык пациента на дне ротовой полости шпателем.

Существует большое количество приспособлений (вакуумных и др.) для аспирации из носовой полости скопившейся там слизи. Но для осуществления данной процедуры подойдет и обычная пластиковая пипетка. Их сейчас выпускают стерильными, разного объема и не только с обычными, но и широкими носиками, что предотвращает закупорку. Такие пипетки нетравматичны и не вызывают стресса даже у детей.

Техника получения смыва из носовой полости также несложна. Пациента усаживают в удобное положение, просят слегка откинуть голову назад и произнести букву «К» (при этом надгортанник закрывает глотку). Одновременно в каждую ноздрю вливают одноразовой пастеровской пипеткой по 1–1,5 мл физиологического раствора. Той же пипеткой аспирируют промывную жидкость со слизью (это удобнее и сопряжено с меньшим риском контаминации посторонней микрофлорой, чем сбор этого материала в чашку Петри или другую емкость самотеком, т.е. когда пациент наклоняет голову вниз и из его носа выливается жидкость). Рекомендуются повторять описанную выше процедуру до тех пор, пока не удастся собрать в стерильный контейнер 10–15 мл промывной жидкости.

Для транспортировки в лабораторию пробы можно помещать в контейнеры со стерильным физиологическим раствором, в который добавляют антибиотики и стабилизатор (бычий сывороточный альбумин). Но стоит ли изобретать велосипед, если можно воспользоваться готовой конструкцией? Ведь есть же специальные транспортные среды, к тому же уже расфасованные по пробиркам, в которые достаточно опустить зонд-тампон! На пробирке со средой уже есть этикетка, предназначенная для нанесения необходимой информации (данные о пациенте, наименование материала, время его сбора и т. д.). Единственное, о чем следует помнить, это то, что транспортных сред много и, соответственно, они имеют разное назначение. Для пересылки в лабораторию материала пользуются специальными транспортными средами, обеспечивающими сохранение титра ВГ в течение длительного срока — до 72 ч.

Выше уже упоминалось о том, что для подтверждения диагноза на грипп рекомендуется дополнительное проведение серологического исследования. Кровь у пациента берут при первичном обследовании на острой стадии инфекции, а затем не раньше, чем через 10–14 дн. Не стоит, наверное, напоминать, что пробирки для сбора крови должны быть без консерванта. Еще лучше, если они будут с ускорителями свертывания крови: гранулярная добавка обеспечивает начало формирования сгустка уже через 15–17 мин и повышает выход сыворотки на 20%, а гелевая, хотя хуже стимулирует ретракцию сгустка, но в большей степени ускоряет процесс коагуляции и надежнее изолирует сыворотку от сгустка и клеток при последующем центрифугировании. В идеале данную процедуру лучше проводить вакуумными пробирками (Vacurette и др.).

Пробирки и контейнеры маркируют таким образом, чтобы избежать утраты информации. Наклеивание этикеток или прикрепление их резиновыми кольцами недостаточно надежно. Лучше пользоваться пробирками и контейнерами с готовыми этикетками или маркерными площадками, а информацию наносить несмываемым маркером, а не ручкой или карандашом. Если воспользоваться пакетом типа «кенгуру», имеющим дополнительный кармашек, то сопроводительное письмо в процессе хранения и пересылки проб в лабораторию будет в безопасности.

В условиях надвигающейся пандемии отечественным врачам, в отличие от многих их зарубежных коллег, по всей видимости, не удастся воспользоваться иммунологическими экспресс-методами диагностики гриппа. Об этом можно лишь сожалеть, т. к. обнаружение вирусных антигенов на этапе первичного обследования пациента обеспечило бы возможность быстрого выявления и локализации источника инфекции, а также своевременное лечение заболевших противовирусными препаратами. Фактор времени в такой ситуации имеет первостепенное значение. Результаты лабораторной диагностики служат критериями окончательного диагноза и конкре-

тизации этиологии болезни. Поэтому в идеале при каждом подозрительном случае для исключения инфекции ВГ H1N1 2009 от пациентов следует брать материал и направлять его в лабораторию.

Соблюдение стерильности при взятии материала, применение герметичных контейнеров и специальных транспортных сред способствуют сохранению ВГ в пробах. Огромную роль во время их доставки в лабораторию играют 2 фактора: время и температура. Транспортировку материалов желательно проводить при пониженной температуре — в большинстве случаев достаточно, чтобы она поддерживалась на уровне от 0 до 4 °С. В таких условиях ВГ способен сохраняться до 100 дн. [Shahid M.A., Abubakar M., Hameed S., Hassan S. Avian influenza virus (H5N1): effects of physico-chemical factors on its survival. *Virology* 2009, 6:38 doi:10.1186/1743-422X-6-38], однако его титр значительно снижается уже в первые двое суток — именно этим сроком и регламентирована пригодность материала для вирусологического и иммунологического исследований. При невозможности доставки сыворотки крови и носового секрета в лабораторию в течение 2 дн. после взятия их можно перевозить в замороженном виде (оптимально при –70 °С), не допуская оттаивания, приводящего к значительному снижению титра ВГ. Частые и значительные колебания температуры охлажденных и замороженных проб ведут к тем же последствиям. Применение термосумок позволяет избежать этого. Их гелевые элементы поддерживают температуру в заданном диапазоне достаточно долго — в течение 6 ч она повышается всего лишь на 3–4 °С. Кроме того, термосумки предотвращают распространение возбудителя при транспортировке патологического материала, и их легко дезинфицировать. В сосудах Дьюара с жидким азотом пробы перевозят в том случае, когда срок транспортировки достигает 7 дн. и более. При отправке материала в зарубежные референтные лаборатории их маркируют как «Биологические субстанции категории В — UN 3373», а изоляты ВГ H1N1 2009 и инфицированные им культуры клеток как «Инфекционные субстанции, опасные для людей UN 2814».

Лабораторная диагностика гриппа основана на обнаружении возбудителя в инфицированных клетках и секретах, а также установлении у пациента сероконверсии (роста титра сывороточных специфических антител). В первом случае пользуются тестами, позволяющими выявлять антигены (в реакции иммунофлюоресценции и других иммунологических тестах) и геном (в ПЦР) ВГ, а также предпринимают попытку изоляции агента из патологического материала в культурах клеток (легче всего это сделать в первые 3 дня после возникновения первых симптомов болезни) с последующей его идентификацией. «Золотым стандартом» диагностики гриппа считают изоляцию ВГ, но чувствительность ПЦР выше.

Разработанные модели развития пандемии свиного гриппа свидетельствуют о том, что по мере ее развития

все страны без исключения будут испытывать нехватку вакцин и противовирусных препаратов. Однако в доступных источниках информации нет упоминаний о необходимости создавать стратегические запасы расходных лабораторных материалов. Сейчас таких проблем пока не возникло, хотя часть ассортимента постепенно переходит в разряд «наиболее востребованных». Вероятно, та же тенденция начинает проявляться и в других странах, что может привести к дефициту расходных лабораторных материалов в конце осени или начале зимы. Без их стратегических запасов может нарушиться нормальная работа диагностических, научных и биопромышленных учреждений.

В заключение хотелось бы напомнить о проблеме безопасности врачей, обследующих пациентов, и лабораторных работников, проводящих такие исследования: основные ее принципы изложены в СП 1.3.1285-03 «Без-

опасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности», МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I–II групп патогенности». Здесь не должно быть мелочей — важны средства индивидуальной защиты (маски, халаты, перчатки, бахилы и т. д.), регулярная дезинфекция помещений и рабочего места, утилизация использованных расходных материалов, стерилизация посуды и предметов, которыми пользуются помещенные в стационар больные. Диагностические исследования проб, полученных от пациентов, предположительно заболевших гриппом свиней, должны выполняться в лабораториях с высоким уровнем безопасности.



Мы сделаем Вашу рукопись книгой!

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.

Сделать Вашу рукопись книгой — наша специальность.

ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

С.Д. ЗАЙКО

ЗАО «Аналитика», Москва

Резюме. В обзоре представлены данные по использованию наборов для выявления норовирусов, основанных на методе иммуноферментного анализа, а также бесприборных экспресс-тестов. Обсуждается возможная область применения этих наборов при вспышках заболевания.

Ключевые слова: норовирус, ИФА, экспресс-тесты.

IMMUNOCHEMICAL DIAGNOSIS OF NOROVIRUS INFECTION

S.D. ZAIKO

Analytica Ltd., Moscow

Summary. The data concerning the application of enzyme immunoassay (ELISA) kits and rapid tests for the detection of noroviruses are presented. The perspectives of the kits' use during the outbreaks of the disease are discussed.

Key words: norovirus, enzyme immunoassay, rapid test.

Острые кишечные инфекции — одна из наиболее серьезных проблем современной медицины. Они являются причиной огромного числа заболеваний по всему миру и, в частности, ежегодно приводят к гибели 2,5–3,2 миллионов детей в возрасте до пяти лет. В развитых странах смертность существенно меньше, чем в развивающихся, однако высокая заболеваемость (десятки миллионов случаев ежегодно) приводит к тяжелым нагрузкам на системы здравоохранения и большим экономическим потерям [18].

Самым распространенным агентом, вызывающим вспышки острого гастроэнтерита, является норовирус (старое название — вирус Норфолк, по названию города в штате Огайо, где он впервые был идентифицирован). Более 90% случаев гастроэнтерита небактериального происхождения и примерно половина всех случаев эпидемиологического гастроэнтерита вызваны норовирусом [4]. Он распространен как в развивающихся, так и в развитых странах, поражает и детей, и взрослых. Контагиозность вируса очень высока. В США ежегодно регистрируется примерно 23 миллиона случаев заболеваний, причиной которых является норовирус [16], — подавляющее большинство всех вызванных вирусами поражений желудочно-кишечного тракта. Причиной большинства острых вирусных кишечных инфекционных заболеваний в России как у детей, так и взрослых также является норовирус [1, 2].

Основным путем распространения являются бытовые контакты, а также заражение при вдыхании аэрозолей, содержащих частицы рвотных масс больного. Вспышки заболевания возникают при санитарных нарушениях, в частности, при попадании содержимого канализации в водопровод [6]. Наиболее часто вспышки происходят в ограниченных группах: в школах, детских

садах, летних лагерях, больницах, лечебно-оздоровительных учреждениях, домах престарелых, на морских судах и т. д.

Попадая во внешнюю среду, норовирус сохраняет жизнеспособность в течение многих дней (до месяца). Он устойчив к воздействию высокой и низкой температуры, некоторых дезинфицирующих средств, ультрафиолетовому излучению. Такая устойчивость является одним из факторов, обеспечивающих высокую контагиозность вируса.

Основными симптомами вызываемого заболевания являются тошнота, сильная рвота, диарея, субфебрильная температура. Заболевание протекает сравнительно легко, иногда бессимптомно. Обычно в течение одного-двух дней больной выздоравливает. Однако у детей, пожилых людей и лиц с ослабленной иммунной системой вызванный норовирусом гастроэнтерит часто протекает в более тяжелых формах и иногда приводит к гибели больного.

Норовирус — одноцепочечный РНК-вирус, принадлежащий к семейству *Caliciviridae*, наряду с тремя другими родами: саповирус, везивирус и лаговирус. Вирусная частица имеет небольшой размер и икосаэдральную форму. Геном (7300–7500 пар оснований) содержит три открытых рамки считывания, кодирующих белок-предшественник вирусных ферментов (ORF1), основной белок капсида с молекулярной массой 57 кДа (VP1, ORF2) и малый структурный белок VP2 (22,5 кДа, ORF3) [22].

В настоящее время выделяют пять различных генотипов вируса, в пределах каждой из которых существует различное число генотипов. Опасность для человека представляют вирусы групп GI и GII, редко — GIV. По данным разных авторов, в состав группы GI входит

8–9, в состав группы GII — 19–23 генотипа [28, 38]. Наиболее распространенными являются генотипы GII-3 и GII-4 [17]. Геногруппы GI и GII значительно различаются по нуклеотидной последовательности, кодирующей основной белок капсида (дивергенция около 60%). Различия между генотипами в пределах одной геногруппы характеризуются 20–30%-ной дивергенцией.

Норовирусы лишены оболочки, поэтому взаимодействие вируса с клеткой хозяина обеспечивается основным белком капсида. Этот белок включает два основных домена: S- и Р-домены, соединяющиеся между собой шарнирным участком из 8–10 аминокислотных остатков. В составе Р-домена, образующего аркообразные выступы с поверхности вирусной частицы, выделяют участки Р1-1, Р1-2 и Р2. Участок Р2 расположен наиболее дистально по отношению к вирусной частице. Последовательность нуклеотидов, определяющая его структуру, отличается высокой вариабельностью. Считается, что именно участок Р2 обеспечивает специфичность взаимодействия с клетками и содержит антигенные эпитопы вируса [9]. Для проникновения вируса в клетку необходимо его взаимодействие с антигенами групп крови, расположенными на поверхности клеток кишечного эпителия и выступающими в качестве рецепторов. Известно не менее восьми различных рецепторных структур, взаимодействующих с вирусами разных штаммов [20] и принадлежащих к антигенам групп А/В и Льюис (несекреторный тип) [21]. В ряде работ предложены модели строения участков, участвующих в связывании с рецепторами [11, 33]. С использованием метода рентгеноструктурного анализа исследовано взаимодействие димерных структур, сформированных доменами Р, с углеводными остатками антигенов-рецепторов [9].

Изучение жизненного цикла норовируса сильно затруднено, поскольку пока не удается получить чувствительную к нему культуру клеток. В работе [32] описана сложная клеточная система, имитирующая *in vitro* структуру кишечного эпителия, но и с помощью нее удалось провести лишь небольшое число пассажей. Существуют культуры клеток, в которых происходит размножение обнаруженного в 2003 году норовируса мышей [35], однако вопрос, насколько они могут служить модельной системой для изучения норовируса человека, остается открытым.

Высокий уровень изменчивости участка Р2 основного белка капсида связан с низкой точностью копирования генетической информации, а также с пострепликативной активностью ферментов. Высокая изменчивость приводит к одновременной персистенции в одном организме хозяина нескольких разновидностей (квазивидов) вируса и высокой частоте рекомбинаций. Образование рекомбинантов приводит к возникновению и циркуляции новых субгенотипов и генотипов [28]. Важным движущим фактором этого процесса является иммунологический отбор.

Функциональная роль белка VP2 точно неизвестна. Предполагается, что он участвует в регуляции экспрессии и стабилизирует структуру капсида [5].

Специфических терапевтических средств, воздействующих на норовирусы, в настоящее время не создано. На модельных системах показано, что гамма-интерферон и рибавирин способны подавлять репликацию вирусной РНК [12, 24].

Методы лабораторной диагностики норовирусной инфекции

1. Электронная микроскопия (ЭМ)

Вирус Норфолк, прототип рода норовирус, был обнаружен при помощи электронного микроскопа в 1986 году. В течение значительного времени ЭМ была единственным методом, пригодным для выявления норовируса, и по-прежнему применяется для лабораторного подтверждения инфекции. К очевидным достоинствам этого метода относится то, что он не зависит от применения специфических для определенного возбудителя реагентов (например, антител или набора праймеров). В результате при исследовании образца может быть обнаружен не только тот инфекционный агент, наличие которого предполагалось.

Чувствительность электронно-микроскопического исследования по сравнению с методами, основанными на выявлении вирусной РНК, невелика и составляет 35–50% [19, 36].

2. Полимеразная цепная реакция

Методы определения вирусной РНК, основанные на полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), являются наиболее чувствительными и широко используются для диагностики норовирусной инфекции [3, 25]. Высокая чувствительность делает их пригодными как при спорадических случаях заболевания, так и для выявления вируса, вызвавшего вспышку. Они применяются также в качестве подтверждающего теста. В то же время эти методы достаточно сложны, требуют наличия специального оборудования и квалифицированного персонала. Анализ проводится в специальных лабораториях, куда должны быть доставлены образцы, предназначенные для исследования. Это приводит к потере времени, которое, учитывая быстроту распространения вируса во время вспышки, часто является определяющим фактором, от которого зависит ее предотвращение. Хотя введение в практику наборов ОТ-ПЦР в режиме реального времени позволяет значительно сократить время, необходимое для проведения анализа, проблема затраты времени на транспортировку образцов остается нерешенной.

3. Иммуноферментный анализ

Параллельно с методами РНК-диагностики для лабораторного определения норовирусов активно применяется широко распространенный метод иммуноферментного анализа (ИФА). Поскольку вирус не удается

выращивать на культуре клеток, разработка методик ИФА стала возможной после получения рекомбинантного белка капсида. Молекулы рекомбинантного белка идентичны природным по антигенным свойствам и способны к самосборке, в результате которой образуются вирионподобная структура. К рекомбинантным антигенам, соответствующим различным геногруппам вируса, были получены поликлональные и моноклональные антитела. С их помощью было показано, что различие в антигенной специфичности вирусов GI и GII соответствует их генетической гетерогенности. Были получены моноклональные [37] и поликлональные [27] антитела, взаимодействующие с консервативными эпитопами, общими для вирусов обеих групп. Материалом для исследования, как правило, являются фекалии больного.

Первые коммерческие ИФА тест-системы (IDEIA NLV производства компании «Dako Cytomation», Великобритания; SRSV(II)-AD производства компании «Denka Seiken Co», Япония) были основаны на классическом «сэндвич»-методе анализа и выявляли антигены вирусов GI и GII порознь. Анализ каждого образца проводился в двух лунках, на поверхности которых были адсорбированы моноклональные антитела, специфичные к антигенам GI и GII соответственно. Для получения конъюгата использовались поликлональные антитела кролика. По данным разных авторов, тест-системы существенно уступали по чувствительности (30–70%) методам ПЦР при сопоставимом уровне специфичности [8, 13, 14]. В то же время показатели чувствительности и специфичности наборов ИФА были сопоставимы с соответствующими показателями ЭМ. Предполагается, что тест-системы могут быть использованы в качестве альтернативы ЭМ при первичном обследовании во время вспышки инфекции, с обязательным исследованием отрицательных образцов методом ОТ-ПЦР [30]. Было признано, что недостаточная чувствительность ИФА тест-систем не позволяет использовать их для диагностики индивидуальных случаев заболевания [29, 30].

Дальнейшее усовершенствование тест-систем привело к существенному улучшению показателей. Так, в ряде работ чувствительность тест-систем нового поколения оценивается как 60–90% при специфичности, близкой к 100% [10, 23, 31]; в то же время в работе E. de Bruin et al. [7] это улучшение не подтверждено. Возможно, различия в результатах связаны с особенностями формирования панелей образцов, на которых проводились исследования, в частности, с процентным содержанием в них вирусов разных генотипов.

Несмотря на повышение качества коммерческих ИФА тест-систем, тактика их применения при вспышках норовирусной инфекции остается прежней: использование наборов для первичного скрининга с обязательным тестированием отрицательных результатов методом ОТ-ПЦР.

ИФА тест-системы также применяют для того, чтобы быстро выяснить, является ли причиной группового заболевания норовирусная инфекция. Для того чтобы получить ответ на этот вопрос, необходимо исследовать несколько образцов. Так, по данным E. Duizer et al. [15], определение антигенов норовирусов в 6 образцах, полученных во время вспышки, позволяет идентифицировать норовирусы как этиологический агент с чувствительностью 92%. Этот показатель лишь немногим уступал чувствительности ОТ-ПЦР (96%), использованной для этой же цели.

Примером ИФА тест-системы, предназначенной для выявления норовируса, является набор RIDASCREEN® Norovirus производства компании «R-Biopharm» (Германия). Он основан на сэндвич-методе твердофазного иммуноферментного анализа. На поверхности лунок полистироловых стрипов иммобилизованы специфические антитела к антигенам разных генотипов вируса. Супернатант суспензий исследуемых и контрольных образцов вносят в лунки одновременно с биотинилированными моноклональными антителами к норовирусу. Образовавшийся на поверхности лунок комплекс «антитело–антиген–биотинилированное антитело» проявляют, добавляя конъюгат стрептавидина с пероксидазой. После промывки добавляют субстратный раствор, содержащий хромоген. Оптическая плотность раствора, содержащего продукты реакции, пропорциональна содержанию антигенов норовируса в исследуемом образце.

Экспресс-тесты

В последние годы созданы и доступны на рынке несколько быстрых иммунохимических тестов для выявления антигенов норовирусов. Тесты основаны на методах иммунофильтрации и иммунохроматографии. Показатели качества экспресс-тестов и иммуноферментных наборов последнего поколения сопоставимы. Их чувствительность составляет, по разным данным, 75–90% [23, 26], а специфичность близка к 100%. Время проведения анализа с помощью экспресс-теста не превышает 15 мин. Как правило, для производства экспресс-тестов применяют несколько антител, специфичных по отношению к антигенам наиболее распространенных генотипов. Так, в тесте RIDA® Quick Norovirus производства компании R-Biopharm использованы 10 антител различной специфичности.

В этом быстром тесте сочетаются иммунохроматографический и иммунофильтрационный принципы. На поверхность мембраны нанесены моноклональные антитела к норовирусу (тестовая полоса) и антитела к IgG мыши (контрольная полоса). Супернатант суспензии, полученной из исследуемого образца, вносят в соответствующее окошко тест-кассеты вместе с биотинилированными антителами к норовирусу. Если образец содержит антигены норовируса, образуется комплекс «антиген–биотинилированное антитело», который миг-



Рис. 1. Интерпретация результатов экспресс-теста RIDAQuick Norovirus:
А — положительный, Б — отрицательный, В и Г — тест проведен неверно, результат интерпретации не подлежит

рирует вдоль мембраны за счет ее капиллярных свойств и связывается с антителами тестовой полосы. В этом случае последовательное добавление конъюгата стрептавидин-пероксидаза и субстратного раствора (иммунофилтрация) приводит к образованию окрашенной полосы. Если норовирус в образце отсутствует, окрашивания тестовой полосы не происходит. О том, что анализ проведен правильно, свидетельствует окрашивание контрольной полосы (рис. 1).

Использование экспресс-тестов для выявления антигенов норовирусов является весьма перспективным направлением в серологической диагностике. При возникновении вспышки заболевания очень важно своевременно установить ее причину и принять соответствующие противоэпидемические меры. Учитывая высокую контагиозность норовируса и быстроту его распространения в популяции во время вспышки, использование в полевых условиях быстрых тестов, простых в применении и не требующих специального оборудования, может оказаться решающим фактором в предотвращении распространения инфекции.

Список литературы

1. Боднев С.А., Тикунов А.Ю., Жираковская Е.В., Юн Т.Э., Никифорова Н.А., Корсакова Т.Г., Клемешева В.В., Тикунова Н.В. Распространенность норовирусов среди детей раннего возраста в г. Новосибирске в 2007 году // Сибирский медицинский журнал, 2008. — № 7. — С. 81–83.
2. Сагалова О.И., Брызгалова И.В., Подколзин А.Т., Малеев В.В. Норовирусная инфекция в многопрофильных стационарах для взрослых // Терапевтический архив, 2009. — № 4. — С. 60–64.
3. Atmar R.L., Estes M.K. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses // Clin. Microbiol. Rev., 2001. — V. 14. — P. 15–37.

4. Atmar R.L., Estes M.K. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection // Gastroenterol. Clin. North Am., 2006. — V. 35 (2). — P. 275–90.
5. Bertolotti-Ciarlet A., Crawford S. E., Hutson A. M., Estes M.K. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein // J. Virol., 2003. — V. 77. — P. 11603–11615.
6. Brown C.M., Cann J. W., Simons G., Fankhauser R. L., Thomas W., Parashar U.D., Lewis M.J. Outbreak of Norwalk virus in a Caribbean island resort: application of molecular diagnostics to ascertain the vehicle of infection // Epidemiol. Infect., 2001. — V. 126. — P. 425–432.
7. de Bruin E., Duizer E., Vennema H., Koopmans M.P. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR // J. Virol. Methods., 2006. — V. 137(2). — P. 259–64.
8. Burton-MacLeod J.A., Kane E.M., Beard R.S., Hadley L.A., Glass R.I., Ando T. Evaluation and Comparison of Two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Detection of Antigenically Diverse Human Noroviruses in Stool Samples // J. Clin. Microb., 2004. — V. 42. — P. 2587–2595.
9. Cao S., Lou Z., Tan M., Chen Y., Liu Y., Zhang Z., Zhang X.C., Jiang X., Li X., Rao Z. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus // J. Virol., 2007. — V. 81. — P. 5949–5957.
10. Castriano S., Luinstra K., Petrich A., Smieja M., Lee C., Jang D., Portillo E., Chernesky M. Comparison of the RIDASCREEN norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools also assayed by RT-PCR and electron microscopy // J. Virol. Methods, 2007. — V. 141(2). — P. 216–9.
11. Chakravarty S., Hutson A.M., Estes M.K., Prasad B.V. Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity // J. Virol., 2005. — V. 79. — P. 554–568.
12. Changotra H., Jia Y., Moore T.N., Liu G., Kahan S.M., Sosnovtsev S.V., Karst S.M. Type I and Type II Interferons Inhibit the Translation of Murine Norovirus Proteins // J. Virol., 2009. — V. 83. — P. 5683–5692.

13. Dimitriadis A., Marshall J.A. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for detection of norovirus in outbreak specimens // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2005. — V. 24 (9). — P. 615–8.
14. Dimitriadis A., Bruggink L.D., Marshall J.A. Evaluation of the Dako IDEIA norovirus EIA assay for detection of norovirus using faecal specimens from Australian gastroenteritis outbreaks // *Pathology*, 2006. — V. 38. — P. 157–65.
15. Duizer E., Pielaat A., Vennema H., Kroneman A., Koopmans M. Probabilities in norovirus outbreak diagnosis // *J. Clin. Virol.*, 2007. — V. 40 (1). — P. 38–42.
16. Fankhauser R.L., Noel J.S., Monroe S.S., Ando T., and Glass R.I. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States // *J. Infect. Dis.*, 1998. — V. 178. — P. 1571–1578.
17. Gallimore C.I., Iturriza-Gomara M., Xerry J., Adigwe J., Gray J.J. Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: emergence and selection of virus variants // *Arch. Virol.*, 2007. — V. 152 (7). — P. 1295–1303.
18. Glass R.I., Bresee J., Jiang B., Gentsch J., Ando T., Fankhauser R., Noel J., Parashar U., Rosen B., Monroe S.S. Gastroenteritis viruses: An overview // *Novartis Found Symp.*, 2001, 238: 5–25.
19. Gonin P., Couillard M., d'Hallywyn M-A. Genetic diversity and molecular epidemiology of Norwalk-like viruses // *J. Infect. Dis.*, 2000. — V. 182. — P. 691–697.
20. Huang P., Farkas T., Marionneau S., Zhong W., Ruvoen-Clouet N., Morrow A.L., Altaye M., Pickering L.K., Newburg D.S., Le Pendu J., Jiang X. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns // *J. Infect. Dis.*, 2003. — V. 188. — P. 19–31.
21. Huang P., Farkas T., Zhong W., Tan M., Thornton S., Morrow A. L. and Jiang X. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns // *J. Virol.*, 2005. — V. 79. — P. 6714–6722.
22. Jiang X., Wang M., Wang K., Estes M.K. Sequence and genomic organization of Norwalk virus // *Virology*, 1993. — V. 195. — P. 51–61.
23. Khamrin P., Nguyen T.A., Phan T.G., Satou K., Masuoka Y., Okitsu S., Maneekarn N., Nishio O., Ushijima H. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples // *J. Virol. Methods*, 2008. — V. 147(2). — P. 360–363.
24. Kyeong-Ok Chang, George D.W. Interferons and Ribavirin Effectively Inhibit Norwalk Virus Replication in Replicon-Bearing Cells // *J. Virol.*, 2007. — V. 81. — P. 12111–12118.
25. Marshall J.A., Bruggink L.D. Laboratory diagnosis of noroviruses // *Clin. Lab.*, 2006. — V. 52. — P. 571–581.
26. Nguyen T.A., Khamrin P., Takanashi S., Le Hoang P., Pham le D., Hoang K.T., Satou K., Masuoka Y., Okitsu S., Ushijima H. Evaluation of immunochromatography tests for detection of rotavirus and norovirus among Vietnamese children with acute gastroenteritis and the emergence of a novel norovirus GII.4 variant // *J. Trop. Pediatr.*, 2007. — V. 53(4). — P. 264–269.
27. Okame M., Shiota T., Hansman G., Takagi M., Yagyu F., Takanashi S., Phan T.G., Shimizu Y., Kohno H., Okitsu S., Ushijima H. Anti-norovirus polyclonal antibody and its potential for development of an antigen-ELISA // *J. Med. Virol.*, 2007. — V. 79 (8). — P. 1180–1186.
28. Phan T.G., Kaneshi K., Ueda Y., Nakaya S., Nishimura S., Yamamoto A., Siguta K., Takanashi S., Okitsu S., Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses // *J. Med. Virol.*, 2007. — V. 79 (9). — P. 1388–400.
29. Rabenau H.F., Stürmer M., Buxbaum S., Walczok A., Preiser W., Doerr H.W. Laboratory Diagnosis of Norovirus: Which Method Is the Best? // *Intervirology*, 2003. — V. 46. — P. 232–238.
30. Richards A.F., Lopman B., Gunn A., Curry A., Ellis D., Cotte-rill H., Ratcliffe S., Jenkins M., Appleton H., Gallimore C.I., Gray J.J., Brown D.W.G. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces // *J. Clin. Virol.*, 2003. — V. 26. — P. 109–115.
31. Sanz J.C., Revilla A., Fernandez M., Herranz N., Moreno S., Sanchez-Fauquier A. Evaluaciyn de dos metodos de detecciyon antigenica por ELISA para el diagnystico de brotes causados por norovirus // *Enferm. Inf. Microb. Clin.*, 2006. — V. 24. — P. 564–567.
32. Straub T.M., zu Bentrup K.H., Orosz-Coghlan P., Dohnalkova A., Mayer B.K., Bartholomew R.A., Valdez C.O., Bruckner-Lea C.J., Gerba C.P., Abbaszadegan M., Nickerson C.A. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses // *Emerg. Infect. Dis.*, 2007. — V. 13. — P. 396–403.
33. Tan M., Huang P., Meller J., Zhong W., Farkas T., Jiang X. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket // *J. Virol.*, 2003. — V. 77. — P. 12562–12571.
34. Trujillo A.A., McCaustland K.A., Zheng D.P., Hadley L.A., Vaughn G., Adams S.M., Ando T., Glass R.I., Monroe S.S. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus // *J. Clin. Microbiol.*, 2006. — V. 44. — P. 1405–1412.
35. Wobus C.E., Thackray L.B., Virgin H.W. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis // *J. Virol.*, 2006. — V. 80. — P. 5104–5112.
36. Yamazaki K., Oseto M., Seto Y., Utagawa E., Kimoto T., Minekawa Y., Inouye S., Yamazaki S., Okuno Y., Oishi I. Reverse transcription-polymerase chain reaction detection and sequence analysis of small round-structured viruses in Japan // *Arch. Virol. Suppl.*, 1996. — V. 12. — P. 271–276.
37. Yoda T., Suzuki Y., Terano Y., Yamazaki K., Sakon N., Kuzuguchi T., Oda H., Tsukamoto T. Precise characterization of norovirus (Norwalk-like virus)-specific monoclonal antibodies with broad reactivity // *J. Clin. Microbiol.*, 2003. — V. 41 (6). — P. 2367–2371.
38. Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., Beard R.S., Glass R.I., Monroe S.S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature // *Virology*, 2006. — V. 346 (2). — P. 312–23.

Редакция научно-практического рецензируемого журнала «Клинико-лабораторный консILIум» приносит свои извинения и восполняет отсутствующий в № 3 (28) июнь 2009 г. на стр. 77 список литературы.

ВЛИЯНИЕ СУХОГО ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО АЭРОЗОЛЯ ХЛОРИДА НАТРИЯ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *STREPTHOCOCCUS PNEUMONIAE*, ПЕРСИСТИРУЮЩЕГО НА СЛИЗИСТОЙ ЛАРИНГОФАРИНГЕАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А. В. ЧЕРВИНСКАЯ*, А. С. КВЕТНАЯ, Т. Б. КОРЖЕНЕВСКАЯ****

*** Респираторный центр ФГУЗ Клинической больницы № 122 им. А. Г. Соколова**

Федерального медико-биологического агентства

**** ФГУ НИИ детских инфекций Росздрава, Санкт-Петербург, Россия**

Резюме. Проведено экспериментальное исследование, позволившее изучить воздействие сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия на жизнеспособность и биологические свойства и персистентные характеристики микроорганизмов, функциональное состояние ларинготрахеального эпителия слизистой передней и заднемедиальной поверхности ротоглотки.

В качестве тест-культуры использовался стандартный штамм *S. pneumoniae*, свойства которого исследовались в экспериментальной аэрозольной камере. Свойства эпителия дыхательного тракта изучались на модели клеток фарингеального эпителия, полученных у 10 волонтеров, до и после ингаляции сухого аэрозоля хлорида натрия. В качестве контроля использован аэрозоль 0,9% раствора хлорида натрия.

Установлено, что сухой высокодисперсный аэрозоль хлорида натрия оказывает ингибирующий эффект на рост и жизнеспособность микроорганизмов, изменяет их биологические свойства. После экспозиции аэрозоля наблюдалось усиление электрофизиологической функциональной активности эпителиальных клеток и возрастание их колонизационной резистентности. Полученные данные свидетельствуют о благоприятном воздействии сухого высокодисперсного аэрозоля хлорида натрия на защитные свойства клеток респираторного тракта и повышении неспецифической защиты организма.

Ключевые слова: сухой аэрозоль хлорида натрия, ингаляции, галотерапия, микроорганизмы, фарингеальный эпителий.

Литература

1. Бобров Л.Л., Пономаренко Г.Н., Середа В.П., Червинская А.В. // *Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физкультуры.* — 1999. — № 4. — С. 8–12.
2. Быченко Д.С. Адаптационные механизмы формирования бактерионосительства токсигенных *Corynebacterium diphtheriae*: Автореф. ... дис. канд. мед. наук. — СПб., 2000. — 23 с.
3. Вишнякова Л.А. // Механизмы воспаления бронхов и легких и противовоспалительная терапия / Под общей ред. Г.Б. Федосеева. — СПб.: «Нормед-Издат», 1998. — С. 67–82.
4. Гончаренко М.С., Ерещенко Е.А. // *Вестн. дерматологии и венерологии.* — 1989. — № 1. — С. 11–14.
5. Грабовская К.Б. // *Стратегия возбудителя в организме хозяина: Сб. науч. тр. / Под. ред. А.А. Тотоляна, Р.Я. Поляк.* — Л., 1987. — С. 122–130.
6. Грабовская К.Б., Тотолян А.А. // *Журн. микробиол.* — 1977. — № 2. — С. 32–36.
7. Дмитриева Н.Ф., Брико Н.И., Вылегжанина Е.С. // *Журн. микробиол.* — 1996. — № 2. — С. 21–24.
8. Духин С.С., Эстрела-Льюис В.Р., Жолковский Э.К. Электроповерхностные явления и электрофильтрование. — Киев: Наук. думка, 1985. — 326 с.
9. Езепчук Ю.В. // *Стратегия возбудителя в организме хозяина: Сб. науч. тр. / Под. ред. А.А. Тотоляна, Р.Я. Поляк.* — Л., 1987. — С. 41–47.
10. Езепчук Ю.В. // *Проблемы инфектологии / Под ред. С.В. Прохоровского.* — М.: Медицина, 1991. — 100 с.
11. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. — М.: Медицина, 1985. — 240 с.
12. Кветная А.С. Микробиологические основы патогенеза пневмококковой инфекции у детей: Автореф. ... дис. докт. мед наук. — СПб., 1995. — 36 с.
13. Копьева Т.Н., Бармина Г.В., Грובה О.М. и др. // *Арх. патологии.* — 1992. — № 9. — С. 5–12.
14. Костюкова Н.Н. // *Журн. микробиол.* — 1991. — № 12. — С. 9–16.
15. Маянский А.Н. // *Нижегородский медицинский журнал.* — 1992. — № 4. — С. 85–91.
16. Семочкина Е.Н., Сильвестров В.П., Сувориков В.Н. // *Кремлевская медицина. Клинический вестник.* — 1999. — № 3. — С. 12–15.
17. Червинская А.В., Коновалов С.И., Страшнова О.В. и др. Применение медтехнологии галотерапии в комплексном лечении и реабилитации заболеваний органов дыхания: Метод. реком. — М. — 1995. — 18 с.
18. Червинская А.В. Ингаляционная терапия / Г.Н. Пономаренко, А.В. Червинская, С.И. Коновалов. — СПб.: СЛП, 1998. — С. 171–225.
19. Чучалин А.Г. // *Пульмонология.* — 1999. — № 2. — С. 6–9.
20. Шмелев Е.И., Чучалин А.Г. Хронические обструктивные болезни легких. — М.: ЗАО «БИНОМ», СПб.: «Невский диалект», 1998. — С. 82–91.
21. Austrian R. // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 1989. — Vol. 8, N 1. — Suppl. — P. 21–22.
22. Gibbons R.J., Van Noute J. // *Ann. Rev. Microbiol.* — 1975. — Vol. 29. — P. 19–44.
23. Ofek I., Beachey E.H. // *Adv. Intern. Med.* — 1980. — Vol. 25. — P. 503–532.
24. Redmann K., Burmeister J. // *Acta biol. et med. Germ.* — 1974. — Vol. 33. — P. 187–196.
25. Riise G.C., Larsson S., Larsson P. et al. // *Eur. Respir. J.* — 1994. — Vol. 7. — P. 94–101.
26. Seamen G.V.F. // *The red blood cell / Ed. By D.M. Surgenor.* — N.Y.: Acad. press. — 1975. — Vol. 2. — P. 1135–1229.
27. Selinger D.S., Reed W.P. // *Infect. Immun.* — 1979. — Vol. 23, N 2. — P. 545–548.
28. Smith H. // *Bacteriol. Revs.* — 1977. — Vol. 41, N 2. — P. 475–500.
29. Smyth C.J., Jonsson P., Olssen E. et al. // *Infect. and Immun.* — 1978. — Vol. 22. — P. 462–472.
30. Tendford T. // *Adv. Biol. And Med. Phys.* — 1970. — Vol. 13. — P. 43–107.

Пресс-релиз
18-ГО КОНГРЕССА
МЕЖДУНАРОДНОЙ ФЕДЕРАЦИИ КЛИНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ЧАСТЬ 2. КУДА ИДЕШЬ, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА:
ЧТО ДЕЛАТЬ С НОВЫМИ БИОМАРКЕРАМИ?

**18th IFCC–EFCC European Congress of Clinical Chemistry
and Laboratory Medicine, Innsbruck, Austria, 7–11 June 2009**
Инсбрук, Австрия, 7–11 июня 2009 года

Когда речь заходит о Конгрессе, то первый вопрос, который задают, это: «Ну и какие теперь новые маркеры?». Вынимаю из кармана список длиной в несколько десятков названий и начинаю зачитывать. На пятом названии обычно говорят: «Так, хватит. А какой маркер самый выдающийся?» — «Ультрчувствительный тропонин». — «Да? А почему?» — «А он определяет тропонины у здоровых людей». Немая сцена.

Но без большого списка, увы, не обойдешься. По крайней мере, сердечно-сосудистых маркеров. Но прежде чем его приведем — несколько слов. Во-первых, для полноты картины в нем есть и некоторые «старые добрые» маркеры. Во-вторых, все они сгруппированы согласно стадиям инициации, развития и завершения сердечно-сосудистых заболеваний. В-третьих, он составлен на основе основных докладов, посвященных сердечно-сосудистым маркерам и сделанных ведущими специалистами. Важнейший из таких докладов — «Куда идешь: перспективы биомаркерного тестирования кардиоваскулярных заболеваний», который сделал др. Хьюго А. Катус¹ (Германия), («Quo vadis² — The perspective of biomarker testing in cardiovascular disease. Hugo A. Katus»). Список (табл. 1) составлен и структурирован благодаря расшифровке молекулярных механизмов

атерогенеза, начиная от его инициации, кончая некрозом миокарда, и включает большое количество молекул, уровни которых повышаются или понижаются при этих патологических процессах. И естественно, что при обнаружении таких маркерных молекул авторы соответствующих научных работ практически в каждом случае предлагают использовать открытые ими закономерности изменения их уровней для диагностических целей. Отличительная черта этих биомаркеров в том, что они количественно характеризуют тяжесть конкретных стадий атерогенеза. Это предполагает, что лечащий врач, назначающий измерение этих биомаркеров, должен более или менее четко представлять цепь биохимических событий, вызывающих атерогенез, связь этих событий с клиническими симптомами и их патологическими последствиями и, в итоге, лечить не симптомы, а биохимические реакции.

Таблица 1

Биомаркеры ССЗ

Окислительный стресс

МПО — Миелопероксидаза

Окисленный X-ЛПНП

Гликозилированные аполипопротеины В и А

PON-1 — параоксоназа 1

Биопиррины мочи (Urinary biopyrrins)

Изопростаны плазмы и мочи

Малоновый диальдегид плазмы (malondialdehyde)

Гомоцистеин

Воспалительный процесс в эндотелии

С-реактивный белок (высокочувствительный)

PTX-3 — пентарксин 3 (pentraxin 3)

α-ФНО — фактор некроза опухолей-альфа

Fas/Apo-1 (CD95) — фрагмент трансмембранного белка I типа, относящегося к семейству ФНО, стимулирующий апоптоз (apoptosis-stimulating fragment of type-I transmembrane protein belonging to the TNF superfamily)

Интерлейкины 1, 6, 18

Неоптерин

¹ Dr. Katus is the chief of internal medicine and director of the cardiovascular medicine department of the University of Heidelberg in Germany. He is president-elect of the Academy of Cardiology of the German Society of Cardiology and editor of Clinical Research in Cardiology (formerly Zeitschrift für Kardiologie), the official journal of the German Cardiac Society.

² Quo vadis, Domine? — лат. Куда ты идёшь, Господи? (Камо грядеши, Господи? — церковно-славянский). Когда после уничтожения Нероном почти всех христиан апостол Петр в страхе покидал Рим, на Аппиевой дороге ему явился Христос. «Quo vadis, Domine?» — спросил ап. Петр. «Ео Romam iterum crucifigi» — «Иду в Рим, чтобы снова быть распятым», — ответил Иисус. Устыдившись своего бегства, Петр вернулся в Рим и принял мученическую смерть. В переносном смысле фраза «Quo vadis» является предложением (сделанным в форме вопроса) задуматься, правильно ли человек живёт, туда ли идёт по жизни, верны ли его жизненные цели, ценности и т. п.

MRP8/14 — белки 8/14, связанные с миелоидом (myeloid-related protein 8/14)

Адипонектин

Витронектин

Ремоделирование сосудов и развитие бляшки

ММП — матриксная металлопротеиназа

ТИМП — тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы

Коллагеновые пропептиды

Пропептид проколлагена типа I

Плазменный проколлаген типа III

LOX — лектин-подобный рецептор 1 для окисленного Х-ЛПНП (Lectin-like oxidized LDL receptor-1)

RAGE — рецептор конечных продуктов гликирования Х-ЛПНП

ЛП(a)

Апо В, Апо А — аполипопротеины В и А

ЛП-ФЛА2 — липопротеин ассоциированная фосфолипаза А2

MCP-1 — моноцитарный хемоаттрактантный белок 1

PAR 1–4 — рецепторы, активируемые протеазой 1 (protease activated receptor 1–4)

Адипонектин

Интерлейкины 10, 18

Нестабильность бляшки

ММП-9 — матриксная металлопротеиназа-9

SAA — сывороточный амилоидный белок А

RAPP-A — плазменный белок, ассоциированный с беременностью — А

ТИМП — тканевой ингибитор металлопротеиназы

МПО — миелопероксидаза

sICAM-1 — межклеточная молекула адгезии 1

sVCAM-1 — молекула адгезии васкулярных клеток

P-selectin — адгезивный белок эндотелия

EFG — сосудистый эндотелиальный фактор роста

sCD40L — растворимый фрагмент мембранного гликопротеина CD40L

PlGF — плацентарный фактор роста

HGF — фактор роста гепатоцитов

Маркеры ишемии

ИМА — ишемически модифицированный альбумин

СЖК — свободные (неэтерифицированные) жирные кислоты

Холин цельной крови

Холин плазмы

GP-BB — гликогенфосфоорилаза BB

Стресс миоцитов (Нейрогуморальная активация)

Норэпинефрин

Ренин

Ангиотензин

Альдостерон

Вазопрессин

Эндотелин

BNP — мозговой натрийуретический пептид

Nt-proBNP — натрийуретического гормона (В-типа) N-концевой пропептид

ANP — предсердный натрийуретический пептид

proANP — предсердный натрийуретический пропептид альфа

Адреномедуллин

Остеопонтин — неколлагеновый адгезивный матриксный белок

GDF-15 — фактор дифференцировки роста-15 (growth differentiating factor 15)

T2 ST2 — белок семейства рецепторов ИЛ-1

Повреждение миоцитов

cTnI, cTnT — кардиальные тропонины I и T

MLC-I — легкая цепь миозина-I (myosin light chain-I)

Myosin light-chain kinase I — легкая цепь миозиновой киназы I

ККМБ (масса)

Миоглобин

DNAse1 — дезоксирибонуклеаза 1

S100A1 — кардиальный сенсорный белок, зависимый от кальция (cardiac-specific Ca(2+)-sensor protein)

H-FABP — кардиальный белок, связывающий свободные жирные кислоты (Heart-type fatty-acid binding protein)

Повреждение сосудов

Креатинин

Цистатин С

Активация коагуляции (системная)

Фибриноген

D-димер

vWF — фактор Виллебранда

Интегрины — поверхностные клеточные рецепторы, взаимодействующие с внеклеточным матриксом и передающие различные межклеточные сигналы

TAT — тромбин-антитромбиновый комплекс III

FPA — фибринопептид А

Активация коагуляции (сосудистая)

sCD40L — растворимый фрагмент мембранного гликопротеина CD40L

PAI-1 — ингибитор активатора плазменогена 1

RANTES — цитокин, член суперсемейства ИЛ-8

P-selectin — белок клеточной адгезии

vWF — фактор Виллебранда

S-TM — растворимый тромбомодулин

Тромбин

TF — тканевой фактор, член семейства цитокиновых рецепторов, связывает FVII/VIIa

Слайд из доклада др. Х. Катуса, на котором была представлена только часть этой таблицы, назывался так: «Биомаркеры: много звезд, да мало рабочих лошадок».

Действительно, не слишком ли много? И какие из них «лучше»? И в каких случаях? Измерять ли их комплексом по одному из каждой группы, (какому?) или последовательно несколькими комплексами, содержащими (для большей надежности) по несколько маркеров из каждой группы?

В принципе, применение этих биомаркеров может быть направлено на: 1) стратификацию рисков ССЗ в общей популяции, 2) стратификацию рисков коронарных событий у лиц с установленным атеросклерозом, 3) диагностику атеросклероза и оценку тяжести его стадий, 4) мониторинг эффективности терапии, 5) дифференциальную диагностику острых коронарных событий (разные типы ИМ, ишемические инсульты), 6) стратификацию рисков у лиц, перенесших ОКС или ИМ.

Биомаркеры стратификации рисков ССЗ

Для решения вопроса о начале первичной профилактики ССЗ обычно применяется оценка традиционных факторов риска согласно показателям Framingham Score [1], или шкалы PROCAM Score [2], или шкалы European Society of Cardiology SCORE [3]. Однако, как неоднократно обнаруживалось, довольно значительное количество лиц, у которых впоследствии развивались серьезные ССЗ, исходно указанных факторов риска не имели [4–6]. Именно это и привело к необходимости поиска более эффективных показателей риска, которые могут использоваться для стратификации рисков, количественно отражать тяжесть патологии и ее стадию и прогнозировать заболевания. Особую ценность имеют маркеры стратификации риска в общей популяции, в особенности у исходно здоровых лиц и у лиц с хроническими формами атеросклероза.

Одномаркерная стратификация рисков в общей популяции

hsCRP. В частности, на основании многочисленных проспективных исследований согласованный на основе консенсуса отчет Американской кардиологической ассоциации (American Heart Association/Center for Disease Control and Prevention (AHA/CDC) consensus report) рекомендует высокочувствительное измерение уровней hsCRP у бессимптомных индивидов [7]. При метаболическом синдроме hsCRP > 3 мг/л повышает риск развития ССЗ и/или сахарного диабета [8, 9].

Фибриноген. Примерно такое же количество проспективных исследований, какое было проведено для выявления прогностической роли hsCRP, было проведено для фибриногена, который представляет собой не только центральный компонент коагуляционного каскада, но и белок острой фазы воспаления. Показана сильная связь между повышенными уровнями фибриногена (> 300 мг/дл), исходами различных ССЗ, а также исходами других заболеваний, таких как онкологические, и общей смертностью [10].

ЛП-ФЛА2. Липопротеин ассоциированная фосфолипаза А2, секретируемая моноцитами/макрофагами/Т-клетками. Образует провоспалительные и проатерогенные молекулы из окисленного Х-ЛПНП [11]. Этот фермент — маркер *локального воспаления в бляшках* и не является маркером системного воспаления. Уровень ЛП-ФЛА2 количественно отражает степень прогрессирования бляшки. Повышенные уровни ЛП-ФЛА2 — предиктор ишемического инсульта [11]. Измерение уровней этих маркеров дает с той или иной степенью достоверности прогностическую и диагностическую информацию. Повысится такая достоверность, если для стратификации рисков измерять сразу несколько маркеров? Что говорят проспективные исследования о многомаркерной стратификации кардиорисков?

Многомаркерная стратификация рисков в общей популяции

СРБ и фибриноген. Одновременное повышение СРБ > 3 мг/л и фибриногена (верхняя тертиль) соответствует соотношению рисков сердечно-сосудистых событий, составляющему 3,45 [12].

СРБ и D-димер. Их высокие уровни дают аддитивный (суммирующий) эффект на определение показателя [13].

Белки ОФ: фибриноген, гаптоглобин, α1-анти-трипсин, церуллоплазмин, орзомукоид. В проспективном исследовании Malmo в течение 19 лет уровни указанных маркеров (а также общий холестерин) измеряли у 6000 здоровых мужчин (28–60 лет). Практически каждый из этих маркеров повышал прогностическое значение, полученное при измерении только одного холестерина. Более того, уровни этих воспалительных белков оказались связанными с фатальными и не фатальными исходами ССЗ и со смертностью от всех причин [14].

17 маркеров: белки воспаления, гемостаза и показатели реологии крови. В исследовании Edinburgh Artery Study у 1600 мужчин и женщин (55–65 лет) в течение 17 лет измеряли уровни маркеров, которые соотносились с коронарными событиями и ишемическими инсультами. Как оказалось, риск ССЗ повышался с повышением количества маркеров с повышенными уровнями (таких как ИЛ-6, фибриноген, тканевой активатор плазминогена, ICAM-1 и др.) [15].

ЛП-ФЛА2 и hs CRP. Поскольку ЛП-ФЛА2 — маркер, независимый от большинства других факторов риска, его использование в многомаркерных панелях представляется многообещающим. В исследовании MONICA / KORA Augsburg (мужчины среднего возраста, длительность наблюдения 14 лет) показан четкий аддитивный эффект повышения обоих маркеров по отношению к показателям рисков коронарных событий [16]. Аналогичные данные получены и в исследованиях ARIC [17] и LURIC [18].

ЛП-ФЛА2, ЛП(a), окисленные фосфолипиды/ apoB. В исследовании Bruneck показан аддитивный

эффект повышения указанных показателей на значения сердечно-сосудистых рисков у мужчин и женщин среднего возраста [19].

Адипонектин X-ЛПВП. Как показали результаты исследования Augsburg MONICA/KORA, низкие уровни адипонектина и X-ЛПВП имели аддитивный эффект на показатели риска ССЗ и СД2 у исходно практически здоровых мужчин [20].

СРБ, тропонин I, NT-proBNP, цистатин С. Исследование ULSAM (1135 лиц, средний возраст 71 год, 10 лет наблюдений) показало, что сочетанное измерение этих маркеров существенно и достоверно дополняет стратификацию рисков тяжелых сердечно-сосудистых исходов, определяемую с помощью шкалы Framingham, особенно у лиц, не имевших предшествовавших ССЗ [21].

10 биомаркеров: hsСРБ, фибриноген, ИЛ-6, растворимые рецепторы фактора некроза опухолей 1 и 2, растворимый антагонист рецептора ИЛ-1, ИЛ-18, sICAM-1, sVCAM-1, Nt-proBNP, микроальбумин. Исследование HOPE (3199 лиц с стабильными ССЗ, 4,5 года наблюдений) включало измерение указанных показателей (наряду с измерением традиционных факторов риска) и их соотнесение с риском ИМ, ишемического инсульта и сердечно-сосудистой смерти. После статистической обработки оказалось, что только NT-proBNP, sICAM-1, растворимый антагонист рецептора ИЛ-1 и фибриноген были достоверно связанными с указанными исходами ССЗ. Однако только добавление значений NT-proBNP повышало прогностическую точность традиционных факторов [22].

Многомаркерная стратификация рисков при ишемии

hsСРБ, ИЛ-6, SA-A гемоглобин. 595 женщин, подозрение на ишемию, коронарная ангиография. Комплекс указанных маркеров предсказывал неблагоприятные исходы более эффективно, чем шкала Framingham Risk Score [23].

Многомаркерная стратификация рисков при хронической сердечной недостаточности

BNP, H-FABP, РТХЗ. Как было ранее показано, РТХЗ (пентраксин) [3] значительно повышен у лиц с метаболическим синдромом и субклиническим атеросклерозом. При наблюдении 164 лиц с хронической сердечной недостаточностью было обнаружено, что у пациентов с повышенным одним маркером риск неблагоприятных исходов был повышен в 5,4 раза, при двух повышенных маркерах в 11,2 раза, при трех — в 34,6 раз, контроль — нормальные уровни всех маркеров [24]. В другом исследовании показано, что у пациентов с застойной сердечной недостаточностью риск неблагоприятных исходов эффективно предсказывают BNP, мочеваЯ кислота, натрий, гемоглобин, креатинин, клиренс креатинина, hsСРБ (наблюдение 154 пациентов) [25].

Стратификация рисков при острой сердечной недостаточности

Цистатин С, сTnT, NT-proBNP. Эффективно предсказывают риск неблагоприятных исходов при острой сердечной недостаточности (138 пациентов) [26].

Стратификация рисков при острой декомпенсированной хронической сердечной недостаточности

BNP, сTnI, hsСРБ. 577 пациентов. Чем выше уровни указанных маркеров, тем выше риск 31-дневной летальности [27].

Стратификация рисков при ОКС

сTnT, H-FABP и NT-pro-BNP. Наблюдались 664 пациента, поступивших в неотложную терапию. Проверена прогностическая способность следующих маркеров: сTnT, H-FABP, гликогенфосфорилаза BB, NT-pro-BNP, фибриноген и D-димер, hsСРБ, МПО, ММП-9, PAPP-A, sCD40L. Наилучшей прогностической способностью обладала панель сTnT, HFABP и NT-pro-BNP [28].

NT-proBNP, ЛП-ФЛА2, холин в цельной крови.

Наблюдались 432 пациента, поступивших в неотложную терапию. Измерялись: сTnI, NT-proBNP, hsСРБ, PlGF (плацентарный фактор роста), ЛП-ФЛА2, D-димер, холин в цельной крови, холин в плазме. Наилучшая комбинация: NT-proBNP, холин в цельной крови и ЛП-ФЛА2 [29].

Стратификация рисков при подозрении на инсульт

BNP, D-димер, ММП-9, S100beta. Наблюдение 155 пациентов, поступивших с подозрением на ишемический инсульт. У 87 (55%), у которых окончательным диагнозом был инсульт, были повышенными указанные маркеры, которые могут быть использованы для триажа [30].

Какими должны быть многомаркерные панели для рутинной практики?

Увы, только того, что данный маркер или многомаркерная панель имеют более высокую связь с риском ССЗ или с их исходами, для рутинной практики «маловато будет». Недавно сформулированы требования как к новым маркерам, так и к их комбинациям. Эти требования относятся к: 1) преаналитическим условиям, 2) методу определения, 3) методу калибровки, 4) степени корреляции с тяжестью патологии и ее исходом, 5) степени дискриминации (специфичности) по отношению к другим патологиям, 6) чувствительности, 7) степени реклассификации пациентов с помощью данного маркера по сравнению с таковой для уже существующих маркеров, 8) длительности определения, 9) стоимости [31–33]. И, разумеется, новые маркеры и многомаркерные панели должны добавлять диагностическую и про-

Тест *hsTnT Elecsys (Roche)***Сравнение характеристик сTnT теста четвертого поколения и hs TnT теста**

	Тесты 4-го поколения	hsTroponin T
Объем образца	15 мкл	50 мкл
Тип образца	Сыворотка, плазма, гепарин, ЭДТА	Сыворотка, плазма, гепарин, ЭДТА
Полное время тестирования	9 (STAT) или 18 мин	9 (STAT) или 18 мин
Диапазон определения	0,01–25 нг/мл	0,003–10 нг/мл
Разведение	01:10:00	01:10:00
Набор	100 и 200 тестов	100 и 200 тестов

гностическую информацию к той, которую дает функциональная диагностика... В целом, для внедрения новых маркеров и многомаркерных панелей в широкую практику необходимы широкомасштабные и многоцентровые исследования и согласованные международные рекомендации.

Ультрочувствительные тропонины: не слишком ли «ультра»?

Докладчики, которые говорили об ультрочувствительных тропонинах (др. *E. Giannitsis*. Ultrasensitive cardiac troponin assays — Diagnosis of acute myocardial infarction and beyond (Германия), др. *P. Venge*. The high sensitive Troponin T assay: Analytical and Chemical Performances (Швеция), др. *E. Fernandez*. Usefulness of a New highly sensitive Troponin I assay in predicting mortality in unselected negative troponin patients as measured by imprecise troponin I assay (Испания) и др. *Panteghini M*. Place of troponin in the «universal» definition of Myocardial Infarction (Италия)), считают, что «в самый раз».

Благодаря применению новых подходов (рекомбинантные белки, нанотехнологии) нижний уровень определения кардиальных тропонинов понижен в 10–100 раз. Разработчики таких тестов называют их или ультрочувствительными (us — ultra sensitive) или высокочувствительными (hs — highly sensitive).

Тест us-cTnI (TnI-Ultra), ADVIA Centaur. Нижний предел определения — 0,009 мкг/л с CV<10% при всех концентрациях. При сравнении диагностической эффективности TnI-Ultra таковой для стандартных тестов на сTnI выявлено пациентов с ИМ на 10% больше, чем при применении стандартных тестов [34]. Другое исследование. *TnI-Ultra Advia Centaur mecma*. Предел определения — 0,06 мкг/л (99 перцентиль, CV 10%) — 0,05 мкг/л, для стандартного сTnI теста CV — 0,3 мкг/л [35].

Тест hs-cTnI (Beckman Coulter hs-cTnI). У 125 здоровых лиц уровень *hs-cTnI* 2,6 нг/л (99 перцентиль, при 20% CV и 10% CV чувствительность *hs-cTnI* составляла 2,95 и 8,66 нг/л, соответственно). В другом исследовании у здоровых лиц уровни *hsTnI* (плазма, литий-гепарин, ЭДТА, 99 перцентиль) составляли 9,20; 8,00, и 8,60 нг/л соответственно. При этом *hs-cTnI* тест обнаруживал повреждения миокарда на более ранних стадиях развития ОКС, чем стандартный сTnI тест (обследовано 108 пациентов) [36].

Популяционные исследования установили, что у здоровых лиц уровни *hsTn T* зависят от пола и возраста. Так, нормальные уровни *hsTnT* (нг/мл) составляют:

- для мужчин, 20–29 лет — 0,004; 30–39 лет — 0,003; 40–49 лет — 0,0045; 50–59 лет — 0,006; более 60 лет — 0,0075,
- для женщин, 20–29 лет — 0,0025; 30–39 лет — 0,002; 40–49 лет — 0,003; 50–59 лет — 0,007; более 60 лет — 0,008.

В другом исследовании уровни *hscTnT Elecsys* в нормальной популяции (500 здоровых лиц, 1251 донор) составляли 13,25 пг/мл, 99 перцентиль. *Чувствительность сTnT Elecsys по сравнению со стандартным тестом сTnT*:

- к ИМ БП ST при поступлении — в 2,25 раза выше,
- к ИМ II ST при поступлении — такая же,
- к нестабильной стенокардии при поступлении в 1,8 раз ниже,
- к некардиальным событиям — такая же [37].

TnI-Ultra тест (Siemens). Пограничное значение 0,04 нг/мл (0,04 мкг/л). Наблюдали 103 пациентов, у которых при поступлении с ОКС были отрицательные значения стандартного сTnI теста (пограничное значение — 0,10 нг/мл (0,10 мкг/л)). Затем уровни стандартного сTnI теста повышались. Однако уровни *TnI-Ultra* при поступлении были повышены у 66 (64,1%) больных [38].

Так что же «чувствуют» ультрочувствительные тесты? Молекулы тропонинов, «вытекающие» из нормального миокарда? Повреждения миоцитов, связанные только с ишемией? Или начало мионекроза?

Повышенный ультрочувствительный тропонин — показатель ишемии?

У 120 здоровых лиц при экспериментально вызванной ишемии измеряли *hs-cTn* (порог чувствительности — 0,2 пг/мл). Перед экспериментом у всех лиц уровни *hs-cTnI* составляли 4,4 пг/мл (медианное значение), межквартильный диапазон — 3,1–8,6 пг/мл. Через 4 часа: 1) у лиц без ишемии уровни *hs-cTnI* не изменились, 2) у лиц с небольшой ишемией (mild) *hs-cTnI* повысился на 1,4 пг/мл (на 24%, медианное значение), 3) у лиц с ишемией «от умеренной до тяжелой» (moderate-to-severe) *hs-cTnI* повысился на 2,1 пг/мл (на 40%). Стандартные коммерческие тесты на сTnI таких изменений не улавливали. Авторы полагают, что «при вы-

званной стрессом транзиторной ишемии повышаются уровни циркулирующих кардиальных тропонинов, измеряемые с помощью hs-cTnI теста. Повышение уровня hs-cTnI >1,3 пг/мл — это независимый предиктор ишемии» [39].

Или маркер мионекроза?

У 195 лиц с подозрением на ИБС вызывали экспериментальную ишемию, которую контролировали с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (single-photon emission computed tomography). Уровни hsTnT определяли перед стрессом, затем через 18 мин, через 4 ч и 24 ч. Показано, что повышение hsTnT — это, скорее, следствие необратимой смерти миоцитов, нежели результат обратимой миокардиальной ишемии, наступающей после физических упражнений или после фармакологического воздействия [40, 41]. Показательны результаты исследования, в котором применялся тест *us cTnI* (Nanosphere, Inc), основанный на применении наночастиц, чувствительность $\geq 0,002$ нг/мл (99 перцентиль). При наблюдении больных с ОКС без подъема ST сегмента положительными считались результаты с уровнями cTnI $\geq 0,10$ нг/мл. Среди 50 пациентов с нестабильной стенокардией (НС), которые согласно стандартным тестам считались «сTnI отрицательными», уровни *us cTnI* повышались в течение 24 ч сначала у 54%, затем у 78%, а потом у 90% больных. Среди 50 больных с установленным ИМ без подъема ST сегмента и с отрицательными результатами стандартных cTnI тестов, 86% и 100% лиц имели положительный *us cTnI* тест в 0 ч и в 2 ч после начала болевого синдрома, соответственно. У лиц без ОКС и без ИМ результаты обоих тестов были отрицательными. Таким образом, *us cTnI* обнаруживает повреждения миокарда у большинства пациентов, у которых согласно текущей классификации диагностируется НС. Это (по мнению авторов) свидетельствует о том, что ишемическая загрудинная боль без повреждения миокарда — событие довольно редкое [42].

Принципиальны данные, которые в своем докладе привел др. П. Венге (табл. 3).

Как изменяется статистика положительных и отрицательных диагнозов ИМ после внедрения hs cTnI (диапазон определения 0,05–0,10 мкг/л)? Оказалось, снижение диагностического уровня от 0,1 до 0,04 мкг/л повысило количество положительных результатов: 1) во всем госпитале — на 44,2%, 2) в отделении неотложной терапии — на 114%. При этом пациенты с низкими значениями положительных уровней (hs cTnI > 0,10 мкг/л) имели ренальные, но не кардиальные нарушения. Авторы полагают, что «более чувствительный cTn тест повысит количество положительных результатов и позволит раннюю диагностику кардиальных нарушений, хотя и будет выявлять патологии, не связанные с ОКС» и отмечают, что применение ультрачувствительных тестов на тропонины повышает количество как истинно поло-

жительных, так и ложноположительных результатов при диагностике ОИМ [43].

Таблица 3

Чувствительность и специфичность теста Elecsys hsTnT для диагностики ОИМ в зависимости от времени, прошедшего после начала болевого синдрома

Часы	Чувствительность, %		Специфичность, %	
	cTnT	hsTnT	cTnT	hsTnT
0	70	93	99	76
0–3 ч	80	96	99	80
3–6 ч	82	100	100	78
6–9 ч	85	98	99	79
9–12 ч	82	94	100	72
> 12 ч	82	100	98	60

Выводы: *hsTnT тест — точный и воспроизводимый, определяет тропонин T у здоровых лиц и выявляет больше пациентов с ОКС, чем тест 4-го поколения* [37].

Решение проблемы снижения ложноположительных тестов на ОИМ было предложено в исследовании, в котором применялся Ultra cTnI Siemens тест. Наблюдали 13 пациентов, поступивших в неотложную терапию с симптомами ОКС. Все пациенты исходно имели повышенные значения Ultra cTnI (0,18–2,12 мкг/л). Однако у 7 пациентов (сердечная недостаточность, почечная недостаточность, гастроэнтерологическое кровотечение, инсульт, тромбоэмболия вен) уровни Ultra cTnI впоследствии снижались или не повышались. Полагается, что «для подтверждения или исключения ОИМ следует проводить серийное определение Ultra cTnI, при этом его повышение на 46% или снижение на 32% является основанием для интерпретации результатов». Авторы считают, что для четкой диагностики при применении теста Ultra cTnI принципиальное значение имеет динамика уровней Ultra cTnI, а не их абсолютные значения [44].

Прогностическое значение ультрачувствительных тропонинов

Прогностическую значимость TnI-Ultra ADVIA Centaur CP assay изучали при наблюдении 201 пациента, поступившего с сердечной болью. Уровни тропонинов определялись различными методами, а именно: Dimension RxL (Siemens, предел определения (ПО) = 0,04 мкг/л, 99 перцентиль = 0,10 мкг/л, 10% CV = 0,26 мкг/л, — VIDAS Troponin I Ultra assay (BioMerieux), ПО = 0,01 мкг/л, 99 перцентиль $\leq 0,10$ мкг/л, 10% CV = 0,11 мкг/л, — ADVIA Centaur CP TnI-Ultra assay (Siemens), ПО = 0,006 мкг/л, 99 перцентиль $\leq 0,04$ мкг/л, 10% CV = 0,03 мкг/л. Показано, что у пациентов с повышенными уровнями тестов VIDAS Troponin I Ultra и ADVIA Centaur CP TnI-Ultra был повышенный риск летальности по сравнению с группой, имевшей нормальные уровни тропонина согласно стандартному тесту

Dimension RxL (Siemens). Повышенные уровни тропонина согласно тесту ADVIA Centaur CP TnI Ultra дополнительно выявили 30% пациентов с риском смертности, повышенным в 10 раз, с помощью стандартных тестов на TnI эти пациенты не выявлялись [45].

В другом исследовании показано, что hsTnT — предиктор неблагоприятных исходов при хронической СН, однако выявляется он только у небольшой доли больных со стабильной хронической СН. Уровни cTnT (предел определения $\leq 0,01$ нг/мл) и hsTnT (предел определения $\leq 0,001$ нг/мл) измерялись в плазме у 4053 пациентов с хронической СН. Оказалось, что уровни cTnT были повышенными только у 10,4% пациентов, а уровни hsTnT — у 92,0%! Более того, у пациентов с уровнями hsTnT выше 0,0012 нг/мл были более тяжелые формы СН и более тяжелые ее исходы [46].

Эффективность и прогностическая ценность теста TnI-Ultra Advia Centaur проверялась при наблюдении 371 пациента, поступившего с ишемическими симптомами, характерными для ОКС. Плазменные уровни тропонина I измерялись в течение 6–24 ч после поступления и сопоставлялись с первым кардиальным событием или с летальностью, произошедшими в течение 60 дней. ИМ был установлен у 49 пациентов (13%). Чувствительность и специфичность теста TnI-Ultra (0,04 мкг/л, 99 перцентиль) составляла при поступлении 74 и 84% соответственно и 94 и 81% к 24 ч. В течение наблюдения произошли две кардиальные смерти, 1 некардиальная, 49 ИМ, 7 случаев шунтирования коронарных сосудов, 36 случаев чрезожого коронарного вмешательства. Количество указанных событий было ниже в группе больных с cTnI $< 0,006$ мкг/л, чем в группе с cTnI 0,006–0,04 мкг/л. Авторы полагают, что тест «TnI-Ultra является чувствительным ранним диагностическим биомаркером ИМ и независимым предиктором неблагоприятных исходов при любых уровнях TnI, измеряемых у пациентов с ОКС» [47].

Тест bioMerieux VIDAS Troponin I проверялся на эффективность диагностики ИМ и стратификации кардиорисков у 435 пациентов, поступивших с ОКС и наблюдавшихся в течение 60 дней. Пограничный уровень для ОИМ — 0,01 мкг/л (99 перцентиль). Показано, что указанный тест — это чувствительный диагностический метод для выявления и предсказания неблагоприятных исходов у пациентов с симптомами ОКС [48].

Ультрасенситивные тропонины при некардиальных событиях

Как оказалось, «высокочувствительные» тропонины повышаются у марафонцев. Уровни hs-cTnT измеряли у 85 бегунов и в контрольной группе (545 человек). После забега у 86% бегунов уровни hs-cTnT были выше 99 перцентили. И только у 45% бегунов были повышены уровни согласно стандартному cTnT тесту. В течение дня уровни тропонинов оставались повышенными [49]. Как известно, повышенные уровни cTn (измеренные

стандартными тестами) предсказывают повышение летальности у пациентов, страдающих от терминальных стадий ренальных заболеваний (ТСРЗ). В шестимесячном наблюдении у 32 пациентов с ТСРЗ уровни hs-cTnT измерялись каждые два месяца (контрольная группа 500 лиц). Оказалось, что через 2 месяца уровни cTnT и hs-cTnT были повышены у 28 больных (81%) через 4 месяца у 32 больных (100%) и через 6 месяцев, у 9 (28%) [50].

Не приведет ли ультрачувствительное определение тропонинов к изменению диагностических критериев ИМ? Действительно, один из главных вопросов, касающихся клинической значимости ультрачувствительного определения тропонинов, — какими должны быть их пограничные уровни. Согласно новым универсальным диагностическим критериям, превышение уровней кардиальных тропонинов (стандартные тесты), характерных для 99-й перцентили, является важным для постановки диагноза ИМ [51]. Разумеется, что для решения этого «вопроса жизни и смерти» необходимы международно согласованные программы крупномасштабных многоцентровых исследований.

Серьезность проблемы усугубляется также и тем, что у тропонинов cTnT и cTnI, согласно недавним открытиям, имеются множественные молекулярные формы, некоторые из которых могут иметь серьезное клиническое значение. Изучение этих форм находится в фокусе современных исследований и разработок. Не принесут ли эти ранее не известные формы тропонинов новые сюрпризы [52]?

В целом, широкое внедрение в практику ультрачувствительных кардиальных тропонинов (если оно будет проводиться) сделает пересмотр диагностических критериев ИМ весьма актуальным [53, 54].

И теперь, в заключение, попытаемся ответить на вопрос, заданный в начале. *Quo vadis?* Куда идешь, лабораторная диагностика? Во-первых, не идет, а летит. Во-вторых: к внедрению новых высокочувствительных и специфичных биомаркеров, характеризующих и прогнозирующих: а) риски возникновения патологий, 2) их стадии, 3) инициацию и развитие их осложнений. Особенно перспективны в этом отношении результаты исследований в области геномики, протеомики и метабономики. В-третьих, к созданию серий многомаркерных панелей, основанных на иммунохроматографии, биосенсорах и нанотехнологиях и применяемых в четко алгоритмизированных комбинациях и последовательностях.

Сумеет ли мы поймать эту птицу за хвост?

Материалы подготовлены В.В. Вельковым, ЗАО «ДИАКОН», 142290, г. Пущино, Московская область, пр. Науки, 5.

Список литературы имеется в редакции.

e-mail: ejvcons@mail.ru, тел.: 8 905 229 60 22

Школа проточной цитометрии
«ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ»
Санкт-Петербург, 22–27 марта 2010 года

Место проведения: Центр лабораторной диагностики,
Санкт-Петербургский государственный медицинский
университет им. проф. И.П. Павлова,
197089, Санкт-Петербург, ул. А. Толстого, 6/8,
тел. 812-234-3407, факс 812-233-9726, моб. 8921-866-6373,
immunology.spbgmu@gmail.com, yekaterina.zueva@gmail.com,
www.immunologica

ИНФОРМАЦИОННОЕ ПИСЬМО № 1
Всероссийская школа
**«Проточная цитометрия в клинической
лабораторной диагностике»**
Санкт-Петербург, 22–27 марта 2010 года

Дорогие коллеги!

Приглашаем вас принять участие в работе третьего заседания всероссийской школы «Проточная цитометрия в клинической лабораторной диагностике». Лекции и практические занятия организованы в форме повышения квалификации врачей клинической лабораторной диагностики, аллергологов-иммунологов, гематологов, а также врачей других специальностей, научных сотрудников, аспирантов, ординаторов и студентов.

В программе семинара планируются:

- ✦ Лекции по диагностической и клинической иммунологии;
- ✦ Практическая работа на проточных цитометрах компании «Beckman Coulter» FC-500;
- ✦ Клинические разборы типичных и спорных случаев.

Организаторы семинара

Российское научное общество лабораторной диагностики
Компания «Beckman Coulter»

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Тематическое усовершенствование **«Проточная цитометрия в клинической лабораторной диагностике»** является дополнительным послевузовским обучением по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика» и «Аллергология и иммунология» и проводится в очно-заочной форме. «Школа проточной цитометрии» включает лекции и практические занятия, направленные на получение знаний и навыков в области иммунологической диагностики гематологических заболеваний с использованием возможностей проточной цитометрии.

Основная характеристика курса — практический подход к проточной цитометрии. Основное внимание курса сосредоточено не столько на базовых вопросах технологии проточной цитометрии, сколько на практике оценки состояния иммунной системы, на вопросах диагностики и мониторинга онкогематологических заболеваний, в том числе выявления и количественной оценки минимальной остаточной болезни.

Курс предназначен для операторов и исследователей, для начинающих и опытных пользователей, которые хотят научиться/освежить свои знания в области проточной цитометрии от самых основ до новых приложений.

Краткое описание курса

Проточный цитометр: технические характеристики и базовые принципы работы прибора

- светорассеяние / флуоресценция;
- жидкости;
- оптика;
- электроника.

Пробоподготовка / Практические аспекты

- калибровка прибора / контроль качества;
- качество подготовки образца: клетки / варианты многоцветного окрашивания;
- обеспечение безопасности: очистка и стерилизация;
- типичные ошибки.

Работа с данными от получения результатов до анализа

- оценка состояния иммунной системы:
 - субпопуляционный состав лимфоцитов;
 - маркеры активации;
 - выявление предрасположенности к определенным заболеваниям;

- диагностика и мониторинг хронических лимфопролиферативных заболеваний;
- диагностика и мониторинг множественной миеломы;
- диагностика и мониторинг острых лейкозов;
- мониторинг минимальной остаточной болезни;
- выявление и количественная оценка гемопоэтических стволовых клеток при планировании трансплантации;
- подготовка отчета и заключения по полученным данным.

Поиск помощи в современной литературе и интернете.

Все слушатели будут разделены для практических занятий на две группы таким образом, чтобы на каждый прибор приходилось не более 5–8 слушателей. Таким образом, будет предоставлена уникальная возможность получения практических навыков с помощью опытных пользователей.

Мы будем благодарны за проявленное внимание и надеемся увидеть Вас на занятиях школы!
С уважением, Оргкомитет