



№ 4 (40) декабрь 2011

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:

Чердниченко Д. В., к. м. н.

Зав. редакцией:

Эмануэль Ю. В., к. м. н.

Редактор перевода:

Филиппова Н. А., к. м. н.

Ответственный секретарь

Джавлах Е. С.

Адрес редакции:

197022, Санкт-Петербург,

ул. Льва Толстого, д. 6/8

Телефон редакции:

(812) 233 97 26

Эл. почта:

eivcons@mail.ru

Журнал зарегистрирован

в Федеральной службе

по надзору в сфере связи,

информационных технологий

и массовых коммуникаций

(Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации:

ПИ №ФС77-38698 от 22.01.2010

Учредитель:

ГОУ ВПО «СПб Государственный

медицинский университет

им. акад. И. П. Павлова

Федерального агентства

по здравоохранению

и социальному развитию»

(197022, Санкт-Петербург,

ул. Льва Толстого, д. 6/8)

Журнал издается при поддержке

ООО «АкваТест СПб»

Санкт-Петербург

Подготовка к печати и печать:

ООО «Издательско-

полиграфическая

компания «КОСТА»,

тел. **(812) 445 10 02**

Санкт-Петербург,

Новочеркасский пр., д. 58

Тираж 2000 экз.

Заказ №



КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Уважаемые коллеги!

На пороге нового 2012 года примите сердечные поздравления и пожелания доброго здоровья и благополучия во всех Ваших делах!

За прошедший год было сделано немало и каждым из Вас, и всем нашим Обществом. Хотелось бы, чтобы в будущем году — со всеми его новшествами в сфере здравоохранения — лабораторная медицина как профессия и каждая клиническая лаборатория как медицинский коллектив, благодаря нашим общим усилиям, обрели новые, более высокие позиции в глазах руководителей медицинских организаций, клинического сообщества и пациентов.

Председатель Правления
Научно-практического общества
специалистов лабораторной медицины
В. Меньшиков

С Новым Годом, дорогие коллеги!

Профессия медицинский работник
Не знает случайных людей.
Она собирает ответственных, честных
И преданных клятве своей.
Храните верность избранной дороге,
И пусть достанет мудрости и сил
Жить счастливо, спокойно, без тревоги,
И чтобы труд наш только радость приносил.

Редакция

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА
«КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ»**

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Антонова И.Н.,
д. м. н., профессор,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Карпишенко А.И.,
д. м. н., профессор, СПб ГУЗ МИАЦ |
| Афанасьев Б.В.,
д. м. н., профессор,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Ларионова В.И.,
д. м. н., профессор, СПбГМА им. И. И. Мечникова |
| Вавилова Т.В.,
д. м. н., СПбГМА им. И.И. Мечникова | Лиознов Д.А.,
д. м. н., доцент, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| Власов Т.Д.,
д. м. н., профессор,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Матвеев С.В.,
д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| Жлоба А.А.,
д. м. н., профессор,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Смирнов А.В.,
д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| Звартау Э.Э.,
д. м. н., профессор,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Сухоруков В.С.,
д. м. н., профессор,
НИЛ общей патологии
НИИ педиатрии и детской хирургии РАМН (Москва) |
| Зыбина Н.Н.,
д. б. н., профессор,
ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС
(Санкт-Петербург) | Хоровская Л.А.,
д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| Зуева Е.Е.,
д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Чухловин А.Б.,
д. м. н., СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| | Эмануэль В.А.,
д. м. н., профессор,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| | Ягмуров О.Д.,
д. м. н., профессор, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ ЖУРНАЛА
«КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ»**

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Айламазян Э.А.,
д. м. н., профессор, академик РАМН, з. д. н. РФ,
НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН (Санкт-Петербург) | Сапрыгин Д.Б.,
д. м. н., профессор, РМАПО (Москва) |
| Дидур М.Д.,
д. м. н., профессор, ФГУ «Федеральный центр сердца,
крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова»
(Санкт-Петербург) | Соколовский Е.В.,
д. м. н., профессор,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| Дубина М.В.,
д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН,
СПбФТНОЦ РАН | Стивен Хау Ян Вонг,
Ph. D., DABCC (TC), FACS,
председатель секции протеомики
и молекулярной патологии AACCC (США) |
| Дюк В.А.,
д. т. н., профессор, СПИИРАН (Санкт-Петербург) | Бринкманн Т.,
адъюнкт-профессор клинической биохимии
медицинского факультета
Университета Рура в Бохуме (Германия) |
| Каллер Андерс,
д. м. н., профессор, Каролинский госпиталь
(Стокгольм, Швеция) | Цыган В.Н.,
д. м. н., профессор, член-корреспондент РАЕН,
ВМА им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург) |
| Мазуров В.И.,
д. м. н., профессор, академик РАМН,
з. д. н. РФ, СПбМАПО | Шляхто Е.В.,
д. м. н., профессор, академик РАМН, з. д. н. РФ,
ФГУ «Федеральный центр сердца, крови
и эндокринологии им. В.А. Алмазова»
(Санкт-Петербург) |
| Петришев Н.Н.,
д. м. н., профессор, академик МАНВШ, академик
РАЕН, з. д. н. РФ, СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | |

ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО	1
РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ, РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ	2
СЕМИНАР В РЕДАКЦИИ ЖУРНАЛА	
<i>Д. Динмамод, Т. Вентон, П. Тиммс</i>	
ГЕЛЕВЫЙ И КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ. ПРИМЕНЕНИЕ РЕФЛЕКС-ТЕСТА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ: ДЕВЯТИЛЕТНИЙ ОПЫТ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ	4
ЛАБОРАТОРНАЯ МЕДИЦИНА И БОЛЕЗНИ ЦИВИЛИЗАЦИИ	
<i>В.Н. Титов, К.В. Иванова, П.П. Малышев, С.И. Каба, Ю.К. Ширяева</i>	
ОБЩНОСТЬ ПАТОГЕНЕЗА СИНДРОМА РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНСУЛИНУ И НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ. НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ТРИГЛИЦЕРИДОВ	11
<i>В.В. Вельков</i>	
РЕВОЛЮЦИЯ В КАРДИОЛОГИИ — ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ИЗМЕРЕНИЕ КАРДИАЛЬНЫХ ТРОПОНИНОВ: «ТРОПОНИН-ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ» БОЛЬШЕ НЕТ.	24
ЛАБОРАТОРНАЯ МЕДИЦИНА И НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ	
<i>В.С. Сухоруков, Н.В. Клейменова, Е.В. Тозлиян, Е.И. Шабельникова, В.А. Белов, А.И. Крапивкин</i>	
ЭНЕРГОДЕФИЦИТНЫЙ ДИАТЕЗ	44
<i>К.Г. Буслов, А.П. Хмырова, В.И. Ларионова</i>	
ЦИСТАТИН С – РАННИЙ МАРКЕР ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ФАБРИ (ПРЕДСТАВЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО НАБЛЮДЕНИЯ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	50
МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ «БИОХИМИЯ – БИОФИЗИКА – ИНФОРМАТИКА — ТРИ КИТА ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ XXI ВЕКА»	
<i>А.В. Семенов</i>	
АКТУАЛЬНОСТЬ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ. ЧАСТЬ I: СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ (КЛАССИФИКАЦИЯ, ОБРАЗОВАНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА)	55
<i>А.К. Мартусевич, В.Л. Эмануэль</i>	
БИОКРИСТАЛЛОМИКА: ПРЕДПОСЫЛКИ, СУЩНОСТЬ, ПЕРСПЕКТИВЫ	66
<i>Р.В. Макаров, А.А. Щеголев, Е.А. Спиридонова, В.Г. Пасько, Г.Р. Самигуллина, В.Н. Лыхин, И.Б. Алчинова, Е.Н. Архипова</i>	
ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ И МОЧИ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА	71
<i>А.П. Лихоносова, Н.П. Лихоносов</i>	
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА	75
ИНФОРМАЦИЯ	
НАЦИОНАЛЬНЫЕ ДНИ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ	86
VII ВСЕРОССИЙСКАЯ ШКОЛА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ	88
НОЦ «ИНСТИТУТ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ». «УПРАВЛЕНИЕ КАЧЕСТВОМ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ»	89
ПРОГРАММА ФОНДА СОДЕЙСТВИЯ РАЗВИТИЮ МАЛЫХ ФОРМ ПРЕДПРИЯТИЙ В НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ СФЕРЕ «УМНИК»	90
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР В МЮНСТЕРЕ: САМАЯ СОВРЕМЕННАЯ ЦЕНТРАЛИЗОВАННАЯ ЛАБОРАТОРИЯ	91
ЗАО «ЛАМИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ». ПЕРСПЕКТИВЫ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОГО СОТРУДНИЧЕСТВА	96

**ГЕЛЕВЫЙ И КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ.
ПРИМЕНЕНИЕ РЕФЛЕКС-ТЕСТА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ:
ДЕВЯТИЛЕТНИЙ ОПЫТ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ**

ДЖИН ДИНМАМОД, ТИМОТИ ВЕНТОН, ПИТЕР ТИММС

**Лаборатория электрофореза, отделение биохимии, Университетская больница Хомертон,
Хомертон Роу, Лондон, Великобритания**

Резюме. Электрофорез сывороточных белков в диагностической лаборатории используется прежде всего для идентификации моноклональных протеинов (иммуноглобулинов в диагностике моноклональной гаммапатии и миеломной болезни, прим. редакции). Успешность выявления моноклональных полос зависит от принятой верхней границы отсекаемого уровня глобулинов для перехода к рефлекс-тесту. Мы попытались оптимизировать условия перехода к этому тесту для обследования мультиэтнической популяции. Для этого мы решили уменьшить уровень сывороточного глобулина для перехода к рефлекс-тесту. **Методы.** В период между 2002 и 2007 гг. переход к рефлекс-тестированию электрофоретическим методом осуществлялся при уровне глобулинов 38 г/л. Между 2008 и 2010 гг. необходимый уровень глобулинов был снижен до 36 г/л. Капиллярный электрофорез использовался с 2004 г., а до этого периода — электрофорез в агаровом геле. **Результаты.** Между 2002 и 2007 гг. этот тест позволил в год дополнительно выявлять в среднем по 190 случаев с моноклональными протеинами. Между 2008 и 2010 гг., на фоне снижения границы исключения по содержанию глобулинов до 36 г/л — было выявлено в среднем по 360 новых случаев в год, при этом из них около 100 пациентов были в возрасте до 60 лет.

Выводы. Не существует определенного соглашения относительно границы исключения по содержанию глобулинов для рефлекс-теста электрофорезом белков плазмы крови. Судя по результатам работы нашей лаборатории, более частая встречаемость моноклональных протеинов при глобулинемии может быть связана как с обследуемой в нашей лаборатории популяцией, так и с принятым нами более низким уровнем глобулинов для перехода к рефлекс-тесту. В нашей практике транзитное выявление моноклональных протеинов было довольно редким, но в то же время обращает на себя внимание количество впервые выявленных пациентов с моноклональной гаммапатией в возрасте до 60 лет.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, гелевый электрофорез, иммунофиксация, иммунотипирование, моноклональный белок, рефлекс-тест, моноклональные гаммапатии, множественная миелома.

**SERUM PROTEIN GEL AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND MONOCLONAL PROTEIN
DETECTION BY REFLEX TESTING: A NINE YEAR DIAGNOSTIC LABORATORY'S EXPERIENCE**

JEAN DEENMAMODE, TIMOTHY VENTON, PETER TIMMS

**Electrophoresis Laboratory, Department of Biochemistry, Homerton University Hospital, Homerton Row,
London, United Kingdom**

Summary. Serum protein electrophoresis in diagnostic laboratories is primarily used for the identification of monoclonal proteins. The potential yield of monoclonal bands is dependent on the globulin cut off and we wished to optimise our current service within a multi ethnic population. We decided to reduce the level of serum globulin for reflex testing. **Methods.** Between 2002, and 2007 electrophoresis was reflex tested at a globulin level of 38 g/L. Between 2008 and 2010 the globulin level fell to 36 g/L. From 2004 capillary electrophoresis was run and prior to that agarose gel was used. **Results.** Between 2002 and 2007 there was a yearly average of 190 previously unknown cases of monoclonal proteins. Between 2008 and 2010 the globulin cut off was reduced to 36 g/L, and on average 360 new cases with monoclonal proteins were detected. Moreover, more than 100 new patients with monoclonal proteins under sixty years old were detected. **Conclusions.** There is no agreement as to the appropriate globulin cut off to reflex an electrophoresis request. The higher incidence of monoclonal proteins detected by our laboratory might be a reflection on the population served by our hospital but it does emphasise that the cut off for reflex testing may not be generic but reflect ethnic variation and population flux. In our practice transient monoclonal proteins were rarely documented but there were an alarming number of quantifiable monoclonal proteins in patients less than sixty years old.

Keywords: capillary electrophoresis, gel electrophoresis, immune fixation, immune typing, monoclonal protein reflex testing, monoclonal gammopathies, multiple myeloma.

Данные для корреспонденции:

Mr Jean Deenmamode, лаборатория электрофореза, отделение биохимии,
Университетская больница Хомертон, Лондон E9 6SR, Великобритания,

тел.: +44 (0)2085105196, факс: +44(0)2085105213, e-mail: jean.deenmamode@homerton.nhs.uk

Введение

Электрофорез белковых фракций в лабораторной диагностике применяется в первую очередь для идентификации моноклональных белков. Признаком, косвенно указывающим на возможное наличие моноклонального компонента, является повышенный уровень сывороточных глобулинов. Мы разработали алгоритм раннего выявления моноклональных белков у этнически разнородной популяции посредством применения рефлекс-теста, основанного на обязательном назначении электрофореза пациентам, уровень сывороточных глобулинов у которых достигал и/или превышал установленные нами пороговые значения (cut-off).

Предпосылки к исследованию

К моноклональным гаммапатиям относят моноклональную гаммапатию неясной этиологии (MGUS), множественную миелому (ММ), макроглобулинемию Вальденстрема (WM), AL амилоидоз, солитарную плазмцитому, В-клеточную индолентную неходжкинскую лимфому и другие В-клеточные лимфопролиферативные заболевания, а также прочие нарушения, ассоциированные с появлением М-белка [1].

Термин MGUS был впервые предложен специалистами клиники Майо (Mayo Clinic) [2] и характеризует состояние, при котором концентрация моноклонального белка в сыворотке не превышает 30 г/л, количество клональных плазматических клеток в костном мозге составляет менее 10%, и у пациента отсутствуют признаки гиперкальциемии, почечной недостаточности, анемии и повреждения костей, характерные для клональных плазматических дискразий [3].

MGUS является предшественником таких серьезных заболеваний, как множественная миелома, первичный амилоидоз и макроглобулинемия Вальденстрема. У большинства пациентов с MGUS моложе 50 лет малигнизация плазматических клеток не наблюдается [4], однако с возрастом вероятность развития злокачественной гаммапатии существенно возрастает [5]. Отмечены расовые различия в выявляемости М-белка: частота встречаемости моноклональных компонентов у черной расы более чем в 2 раза выше по сравнению с белой расой [6].

Асимптоматическая, или тлеющая миелома является следующей после MGUS стадией, для которой характерны повышение концентрации М-белка до 30 г/л и более, содержание плазматических клеток в костном мозге выше 10% при одновременном отсутствии выраженных органических повреждений [3].

Множественная миелома — это достаточно распространенное онкогематологическое заболевание, — ежегодно в Великобритании диагностируется до 4000 новых случаев миеломы. В Великобритании реестр больных множественной миеломой с медианой выживаемости 4–5 лет находится приблизительно на одном уровне и составляет от 20 до 30 тысяч пациентов. Заболевание характеризуется тремя основными клиническими призна-

ками, важнейшим из которых являются костные боли или патологические переломы, возникающие вследствие инфильтрации костей скелета раковыми клетками. Вторым признаком является наличие моноклонального белка и, наконец, третьим — повышение (> 10%) содержания плазматических клеток в костном мозге [7].

При скрининге у пациентов довольно часто обнаруживается М-компонент в низких концентрациях, что, как правило, характерно для стадии MGUS, однако в ряде случаев низкое содержание моноклонального белка может являться клиническим признаком таких заболеваний, как AL амилоидоз, миелома легких цепей или солитарная плазмцитома [1].

Мониторинг за изменением концентрации моноклонального белка помогает выявить трансформацию в раковое заболевание на ранней стадии, когда выраженные признаки болезни, включая необратимые литические изменения костной ткани, повреждения почек и другие специфические симптомы, еще отсутствуют, а состояние пациента позволяет проводить максимально эффективную терапию [1].

Оснащение нашей лаборатории в марте 2002 г. полуавтоматической системой гелевого электрофореза открыло возможности для использования данного метода в качестве рефлекс-теста для пациентов, у которых проводилось измерение общего белка и альбумина сыворотки (стандартный перечень тестов для оценки функции печени), и, следовательно, можно было определить концентрацию глобулинов расчетным способом. В связи с тем, что национальные стандарты диагностики не включали рекомендаций относительно пороговых значений глобулинов для рефлекс-назначения электрофореза, нами было принято решение назначать электрофорез всем пациентам, концентрация сывороточных глобулинов у которых составляла не менее 40 г/л (референсным диапазоном в нашей лаборатории является 28–35 г/л).

Хронология, отражающая изменение алгоритма назначения электрофореза в зависимости от принятых пороговых уровней сывороточных глобулинов, приведена в таблице 1.

Данная статья описывает разработанный нами рефлекс-тест для назначения электрофореза и детекции моноклональных белков у местной многонациональной популяции.

Материалы и методы

Наша лаборатория обслуживает 433-коечную центральную районную больницу восточного Лондона и 50 городских амбулаторных хирургических отделений общего профиля. Численность населения обслуживаемого района в 2008 году составляла 212 000 жителей, доминирующей возрастной группой которого являлось население в возрасте 20–44 лет [8].

С марта 2002 года образцы сыворотки пациентов, которым назначались функциональные пробы печени, включая анализ общего белка (биуретовая реакция,

Таблица 1. Хронология использования методов электрофореза и пороговые значения сывороточных глобулинов для рефлекс-теста

Период	Метод электрофореза	Пороговое значение глобулинов
До января 2002 г.	Электрофорез в гелях агарозы	Не установлено
Февраль – март 2002 г.	Электрофорез в гелях агарозы	40 г/л
Апрель 2002 – декабрь 2003	Электрофорез в гелях агарозы	38 г/л
Январь 2004 – сентябрь 2008	Капиллярный электрофорез	38 г/л
Октябрь 2008 – по настоящее время	Капиллярный электрофорез	36 г/л

Abbot, UK) и альбумина сыворотки (реакция с бромкрезоловым красным, Abbot, UK), подвергались рефлекс-тесту методом электрофореза. В качестве порогового значения расчетного глобулина (общий белок за вычетом альбумина) для рефлекс-назначения электрофореза был выбран уровень 40 г/л (референсные значения сывороточного глобулина составляют 28–35 г/л). Из исследования исключались пациенты моложе 21 года, пациенты из отделения гинекологии, женской консультации, родильного отделения, а также пациенты с серьезными поражениями печени.

С марта 2002 по декабрь 2003 анализ белковых фракций сыворотки крови проводили методом агарозного электрофореза на полуавтоматическом анализаторе Hydrasys® (Sebia, UK). Количественная оценка полученных электрофоретических профилей, окрашенных амидовым черным, и интерпретация результатов проводились методом денситометрии при помощи программного обеспечения Phoresis® (Sebia, UK).

С января 2004 анализ белковых фракций сыворотки крови проводили методом капиллярного электрофореза на автоматическом анализаторе Capillarys® (Sebia, UK) с использованием прямой денситометрии фракций при помощи программного обеспечения Phoresis® (Sebia, UK).

Идентификацию обнаруженных моноклональных белков осуществляли посредством иммунофиксации в гелях агарозы (Sebia, UK), а начиная с 2007 года — при помощи иммунотипирования методом капиллярного электрофореза (Sebia, UK).

В случае проведения электрофореза белков мочи разцы мочи предварительно очищали на микроколонках (Geneon, UK), измеряли общий уровень белка (реакция с хлоридом бензетония, Abbott, UK) и концентрировали в 4 раза на концентраторах Vivaspin 500 (Sartorius, UK), если количество белка не превышало 0,2 г/л. Подготовленную таким образом мочу далее анализировали методом агарозного электрофореза с последующим окрашиванием фиолетовым кислым на системе Hydrasys® (Sebia, UK). Иммунофиксацию обнаруженных в моче моноклональных белков также проводили на очищенных и сконцентрированных образцах мочи с использованием набора “Hydragel Bence Jones kit” (Sebia, UK) на системе Hydrasys® (Sebia, UK).

Результаты

Корреляция результатов гелевого и капиллярного электрофореза была очень высокой (коэффициент корреляции $R^2 = 0,9$) для большинства фракций. Уравнение прямой по фракции альбумина имело вид: $y = -5,96 + 1,08x$; по альфа-1: $y = 0,73 + 1,53x$; по альфа-2: $y = -1,62 + 1,05x$; по бета-1: $y = 3,15 + 0,37x$; по бета-2: $y = 0,39 + 1,11x$, по гамма: $y = 2,7 + 0,95x$, где y — значение, полученное методом капиллярного ЭФ, а x — значение, полученное методом электрофореза в гелях агарозы.

Единственное исключение составила фракция бета-1 ($R^2 = 0,5$), белки которой в гелях агарозы образуют более широкую зону миграции.

В период с 2002 по 2007 г. мы изменили пороговое значение сывороточных глобулинов для рефлекс-назначения электрофореза, понизив его с 40 до 38 г/л. Как и ожидалось, количество впервые выявляемых моноклональных белков сначала существенно возросло, а затем стало постепенно снижаться. Однако в период с 2006 по 2007 г. количество новых случаев моноклональных гаммапатий вновь неожиданно выросло. Мы полагаем, что это связано с всплеском сезонных вирусных заболеваний в указанный период времени по причине аномально холодной зимы и, как следствие, увеличением обращений в нашу больницу. В целом понижение порогового уровня глобулинов до 38 г/л позволило увеличить эффективность рефлекс-теста для выявления моноклональных белков методом электрофореза (рис. 1).

Ежегодное соотношение типов моноклональных компонентов, идентифицированных в период с 2003 по 2007, в среднем составило: 64–73% для IgG; 12–19% для IgA; 8–15% для IgM; 0,4–2% для kappa и 3–7% для lambda цепей, что практически соответствовало ранее опубликованным данным [5].

В период с 2008 по 2010 г. пороговое значение сывороточных глобулинов было понижено до 36 г/л. В результате этого выявляемость моноклональных белков выросла почти в 2 раза (рис. 1). Так, за первые 12 месяцев экспериментального снижения порогового значения глобулинов на 2 г/л удалось дополнительно выявить 159 пациентов с парапротеинемиями, которые не были бы диагностированы в случае использования порогово-

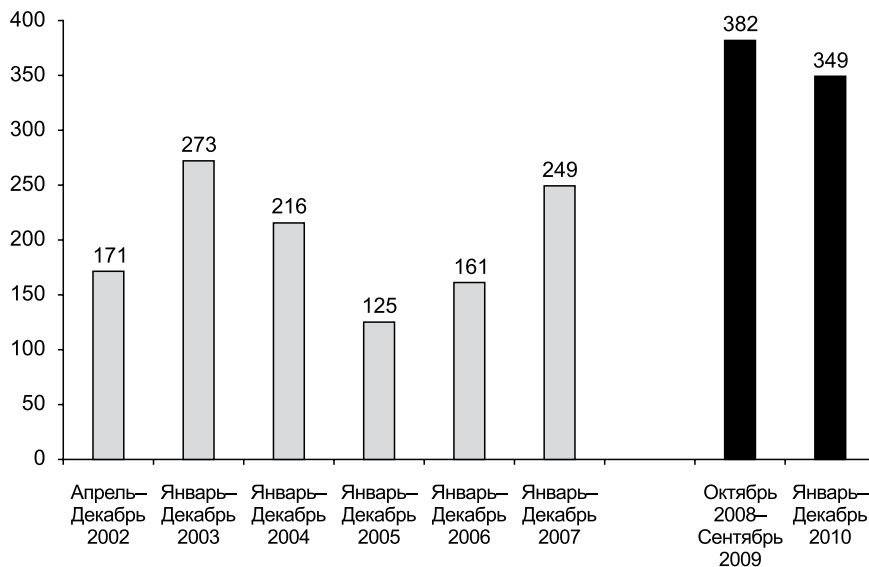


Рис. 1. Количество новых случаев моноклональных гаммапатий, выявленных в период с апреля 2002 г. по сентябрь 2007 г. при пороговом уровне глобулинов 38 г/л, а также в период с октября 2008 по декабрь 2010 при пороговом уровне глобулинов 36 г/л

го значения 38 г/л. Причем у 135 пациентов концентрация моноклонального белка превышала 2 г/л, что позволяло провести количественную оценку М-компонента.

Результаты проведенного исследования позволили клиницистам и врачам общей практики по-новому оценить диагностические возможности электрофореза, что в свою очередь обусловило увеличение назначений данного теста. Результатом этого стало выявление в течение 2008–2009 гг. 111, а в 2010 г. — 53 новых случаев моноклональных гаммапатий у пациентов, уровень сывороточных глобулинов у которых был ниже 35 г/л. В ряде случаев до назначения электрофореза сыворотки у пациентов был выявлен белок Бенс-Джонса в моче.

Использование порогового значения сывороточных глобулинов, равного 36 г/л, позволило выявить 183 и 151 новый случай моноклональных гаммапатий у пациентов моложе 60 лет в период с 2008 по 2009 и с 2009 по 2010 г., соответственно. Три из этих случаев представлены в таблицах 2, 3 и 4.

Обсуждение

До внедрения рефлекс-теста электрофорез белковых фракций в нашей лаборатории проводили исключительно по назначению врача-клинициста. Выявление моноклональных компонентов при этом было редким и случайным. Такие симптомы как костные и поясничные боли или анемия являются неспецифичными и использование их в качестве маркеров миеломы имеет низкое практическое значение и неэффективно с экономической точки зрения.

Применения рефлекс-теста привело к непредвиденно высокому выявлению моноклональных белков. Использование в качестве пороговых уровней сывороточных глобулинов для назначения электрофореза значений между 36 и 40 г/л позволило в период с 2008 по

2009 г. выявить все моноклональные компоненты в концентрации от 1 до 19 г/л (рис. 2). Последующий мониторинг пациентов с моноклональными белками показал, что, несмотря на то, что в момент диагностики гаммапатии могли иметь доброкачественный характер, в дальнейшем многие из них переходили на стадию малигнизации даже в тех случаях, когда начальная концентрация М-компонента была достаточно низкой, что проиллюстрировано в таблице 3.

Риск развития злокачественного заболевания независим от концентрации М-белка значительно выше у пациентов в возрасте 40–50 лет, нежели у тех, чья страховая продолжительность жизни, как правило, не превышает 2–3 года [1]. В нашей популяции этот показатель был еще более выражен среди лиц моложе 40 лет.

Согласно литературным данным, моноклональные белки IgA и IgM представляют собой гаммапатии с повышенным риском к малигнизации. Исследование, проведенное в клинике Майо (Mayo), показало, что существует строгая взаимосвязь между концентрацией М-белка и риском развития злокачественного заболевания [9]. Статистический анализ показал, что в Великобритании риск развития множественной миеломы составляет 1 к 148 у мужчин и 1 к 186 у женщин. Эти соотношения были получены в феврале 2009 г. посредством обработки данных по заболеваемости и смертности за период с 2001 по 2005 г. [10].

Важно отметить, что более чем в 40% случаев диагностика миеломы проводится с существенным запозданием (более 6 месяцев). Наиболее часто запоздалый диагноз ставится пациентам, которые первично консультировались у врачей общей практики (табл. 3) [7].

Также наши исследования показали, что после первичного выявления моноклональных белков многие

Таблица 2. Иллюстрированный пример № 1 (N = норма, E = повышенное значение, B2M = бета-2-макроглобулин)

	Концентрация М-белка, г/л	ЛДГ	B2M
Июнь 2005	13,8	N	N
Июнь 2006	17,8	N	N
Ноябрь 2006	18,3	N	N
Май 2007	20,4	N	N
Ноябрь 2007	25,7	N	N
Январь 2008	27,6	N	N
Июль 2008	30,2	N	N
Август 2009	39,4	N	N
Декабрь 2009	47,6	N	N
Апрель 2010	59,7	N	E

Женщина. Отделение скорой медицинской помощи. Грудные боли (симптомы сердечной недостаточности). Биохимические исследования не выявили признаков сердечной патологии. Уровень сывороточных глобулинов составил 38 г/л, на основании чего был применен рефлекс-тест – электрофорез белков сыворотки. Несмотря на гемолиз пробы, оказалось возможным выявить моноклональный компонент. Последующая идентификация подтвердила наличие моноклонального белка IgG лямбда. В ходе мониторинга было зафиксировано прогрессирующее увеличение концентрации М-компонента. Заподозрить моноклональную гаммапатию у данной пациентки без применения рефлекс-теста или при использовании более высокого порогового уровня сывороточных глобулинов – 40 г/л – было бы абсолютно невозможно.

Первоначально больной был поставлен диагноз асимптоматичная миелома. В мае 2010 года на основании биопсии костного мозга была диагностирована множественная миелома. Примечательным является тот факт, что на момент первичного выявления моноклонального компонента пациентке было всего 23 года.

Концентрация М-компонентов, выявленных в период с 1 октября 2008 г. по 30 сентября 2009 г.

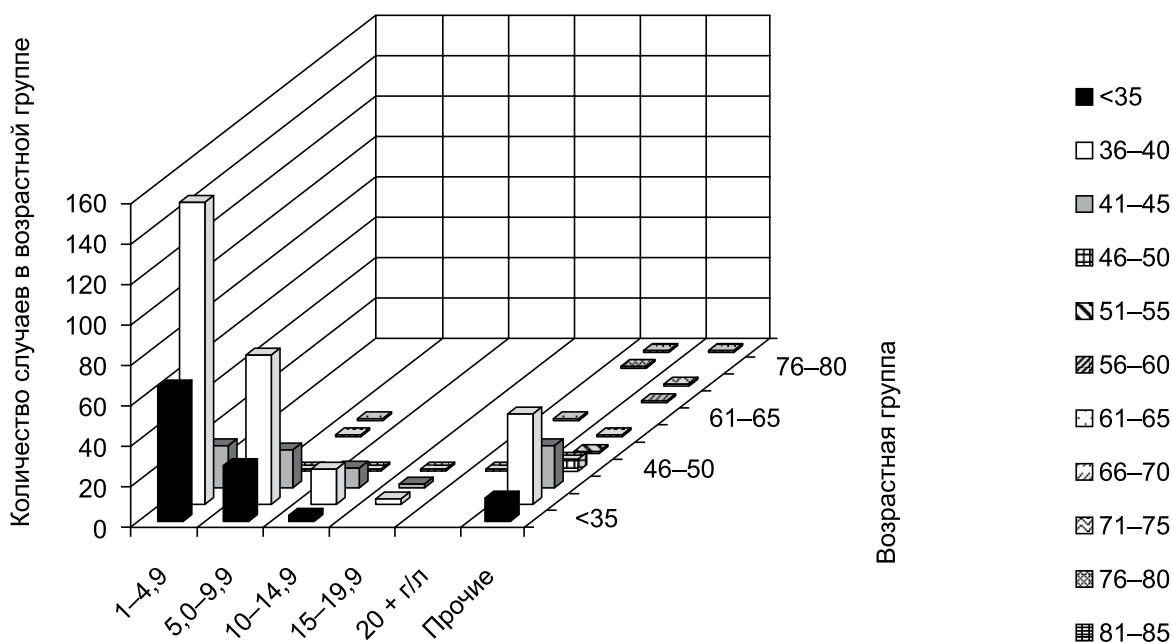


Рис. 2. Результаты электрофореза, полученные в период с октября 2008 по сентябрь 2009 г. при использовании порогового значения глобулинов 36 г/л

Данный трехмерный рисунок отображает количество случаев вновь выявленных моноклональных компонентов при пороговых значениях сывороточных глобулинов от 36 до 40 г/л. Последующий мониторинг показал, что большинство М-белков, выявленных в низкой концентрации, не было временным. Ряд данных на рисунке, обозначенный как «прочие», включает выявленные моноклональные компоненты, концентрация которых была слишком мала для количественной оценки, а также парапротеины, идентифицированные как легкие цепи

Таблица 3. Иллюстрированный пример №2

Дата	Общий белок (60–85 г/л)	Альбумин сыворотки (38–50 г/л)	Глобулины сыворотки (г/л)	М-белок (г/л)	ЛДГ 125–243 ед/л	В2М <2,2 мг/л	Клинические данные
12.09.2005	79	39	40	Сомнительный результат			
15.03.2006	77	38	39	Слабый М-компонент лямбда			лапароскопия коленной грыжи
29.09.2006	76	38	38	IgG лямбда 3,1	629	3,28	удаление эпигастральной грыжи
27.07.2007	79	38	41	4,3			головокружения
18.12.2007	80	35	45	4,4			
28.02.2008	80	34	46	5,4			
01.08.2008	87	38	49	8,4	223	4,76	
26.11.2008	75	36	39	7,4			грустные боли, тропонин I отрицательный
04.02.2009	85	37	48	10	199	4	
24.12.2009	77	36	41	9,7		4,62	глюкозурия, гематурия
19.05.2010	114	33	81	45,7			абдоминальные боли
24.05.2010	96	25	71	41,3	609	23,7	
01.06.2010	106	26	80	51	718	1,46	

Это один из многочисленных примеров, подтверждающий, что выявление слабого или «неявного» моноклонального компонента не должно игнорироваться или приниматься за временное явление.

Рефлекс-тест послужил поводом для более тщательного мониторинга за состоянием здоровья 56-летней пациентки, рассмотренной здесь в качестве примера. Первоначально иммунофиксация не дала однозначного результата относительно природы М-белка; спустя 6 месяцев были идентифицированы моноклональные легкие цепи лямбда и, наконец, еще через полгода концентрация М-компонента возросла до уровня, позволившего идентифицировать полноценный моноклональный белок. Обращает на себя внимание существенное возрастание концентрации парапротеина в мае 2010 года.

Таблица 4. Иллюстрированный пример №3 (b+f = связанные и свободные легкие цепи, Neg = отрицательный)

Дата	Общий белок (г/л)	Альбумин сыворотки (г/л)	Глобулины сыворотки (г/л)	Моноклональный белок (г/л)	Иммунофиксация белка Бенс-Джонса в моче	Белок мочи (г/л)	Клинические данные
12.02.2007	95	37	58	27			
19.03.2007					b+f лямбда	0,45	
25.04.2007	94	37	57	27,5			«монетные столбики»
12.07.2007	87	33	54	27,5			
04.03.2008	98	26	72	43,1			симптомы пневмонии
10.12.2008					слабые b+f лямбда	0,16	
17.12.2008	74	35	39	4,8			
08.01.2009	63	27	36	4,3			
16.01.2009	70	33	37	3,6			
09.02.2009	75	40	35	4			
21.04.2010	68	36	32	Neg!	Neg!	0,1	
06.03.2011	77	40	37	Neg!			

Мужчина, 55 лет. При первом обращении в феврале 2007 года выявлен моноклональный белок IgG каппа. В апреле 2007 года биопсия костного мозга показала наличие плазматических клеток, составлявших 17% от общего числа ядерных клеток, а также большое количество незрелых и крупных клеток, характерных для множественной миеломы.

Лабораторная диагностика показала постепенное уменьшение и исчезновение моноклонального белка в период с декабря 2008 г. по март 2010 г. Клиническая картина и заключение будут приведены в отдельной публикации.

Таблица 5

	2005 г.	2006 г.	2007 г.	2008 г.	2009 г.	2010 г.
Электрофорез белков сыворотки	6808	8420	14 394	20 243	32 394	39 208
Иммунофиксация/ иммунотипирование сыворотки	786	776	1008	1351	1990	2248
Электрофорез белков мочи	400	454	528	540	761	839
Иммунофиксация мочи	112	93	118	227	464	311

Данная таблица отражает статистику по количеству ежегодно проводимых рефлекс-тестов методом электрофореза и характеристику выявленных М-белков. Наблюдается постепенный рост назначений электрофореза мочи для детекции белка Бенс-Джонса, что является неотъемлемой частью эффективного ведения пациента и мониторинга развития гаммапатий.

врачи не всегда прибегают к дальнейшему мониторингу уровня М-компонента, что противоречит существующим рекомендациям. Разработанный алгоритм рефлекс-анализа оказался эффективным в отношении мониторинга уровня моноклонального белка, т. к. он дает возможность назначать электрофоретическое исследование «автоматически», независимо от квалификации врача, что позволяет контролировать состояние пациента с большей эффективностью. Согласно рекомендациям по ведению пациентов с MGUS количественную оценку М-компонента было бы целесообразно проводить всякий раз, когда пациенту назначается какой-либо анализ крови [1].

В связи с тем, что в мире прослеживается тенденция к росту заболеваемости миеломой, крайне необходимо обратить внимание общественности, включая медицинское сообщество, на эту проблему [7]. Для оптимизации работы врачей общей практики мы осуществляем методическую поддержку, консультируя хирургов общей практики по вопросам выявления М-компонента и интерпретации результатов электрофореза. С этой целью мы разработали систему электронных комментариев к результатам лабораторных исследований, проводим обучающие семинары, а также выпускаем информационные буклеты с ключевыми рекомендациями по ведению гаммапатий и интерпретации результатов электрофореза.

Наша диагностическая служба, занимающаяся идентификацией, описанием и количественной оценкой моноклональных белков методом электрофореза, выявила неожиданно высокое количество новых случаев моноклональных гаммапатий, которые не были бы обнаружены без использования разработанного нами рефлекс-теста с применением этически приемлемого показателя в виде порогового уровня сывороточных глобулинов и «интеллектуальной» системы обработки результатов.

Дополнительная информация с рекомендациями по ведению пациента, прилагаемая к результатам исследования, оказалась полезной и для гематологов, разрабатывающих алгоритмы лечения.

По всей видимости, снижение порогового уровня глобулинов до 36 г/л может по-прежнему быть не вполне достаточным, поскольку нами было зафиксировано большое число пациентов, у которых при данном пороговом значении была выявлена выраженная гаммапа-

тия. Такая диагностика была особенно важна в случаях выявления М-компонента у пациентов моложе 60 лет, т. к. это дает основание говорить именно о ранней диагностике гаммапатий, потому как обычно моноклональные белки выявляют существенно позже.

В целях предотвращения конфликта интересов авторов спустя семь лет с момента запуска этой независимой и оказавшейся успешной научно-практической работы наши разработки были представлены на симпозиумах и конференциях в Великобритании и за рубежом при поддержке первого автора из английского представительства компании Sebia, UK.

Литература

1. Bird J., Behrens J., Westin J., Turreson I., Drayson M., Beetham R. et al. UK Myeloma Forum (UKMF) and Nordic Myeloma Study Group (NMSG): guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *British Journal of haematology*. 2009; 147: 22–42.
2. Kyle R.A. Monoclonal gammopathy of uncertain significance; natural history in 241 cases. *Mayo Clinic Proceedings*. 1978; 50: 29–40.
3. Kyle R.A., Rajkumar S.V. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Curr. Haematol. Malig Rep*. 2010 Apr; 5 (2): 62–69.
4. Bida J.P., Kyle R.A., Therneau T.M., Melton III L.J., Plevak M.F., Larson D.R. et al. Disease associations with monoclonal gammopathy of undetermined significance: A population-based study of 17 398 patients. *Mayo Clin. Proc*. 2009; 84 (8): 685–693.
5. Kyle R.A., Therneau T.M., Rajkumar S.V., Larson D.R., Plevak M.F., Offord J.R. et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine*. 2006; 354: 1362–1369.
6. Cohen H.J., Crawford J., Rao M.K. et al. Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly. *American Journal of Medicine*. 1998; 104: 439–444.
7. Kariyawasan C.C., Hughes D.A., Jayatilake M.M., Mehta A.B. Multiple Myeloma: causes and consequences of delay in diagnosis. *Q. J. Med*. 2007; 100: 635–640.
8. Hackney Council. Population statistics. Available at: <http://www.hackney.gov.uk/xp-factsandfigures-mye.htm>. Accessed: 9 March 2011.
9. Kyle R.A., Therneau T.M., Rajkumar S.V., Offord J.R., Larson D.R., Plevak M.F., Melton III L.J. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346: 564–569.
10. Cancer Research UK. Statistical Research Team, Cancer Research UK, 2009. Available at: <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/multiplemyeloma/incidence/#source5>. Accessed: 9 march 2011.

ОБШНОСТЬ ПАТОГЕНЕЗА СИНДРОМА РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНСУЛИНУ И НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ. НАРУШЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ТРИГЛИЦЕРИДОВ

В.Н. ТИТОВ, К.В. ИВАНОВА, П.П. МАЛЫШЕВ, С.И. КАБА, Ю.К. ШИРЯЕВА
ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития РФ, Москва

Резюме. Патогенез неалкогольной жировой болезни печени — стеатоза остается неясным, как и гибель гепатоцитов по типу апоптоза, развитие биологической реакции воспаления, превращение стеатоза в стеатогепатит с последующим фиброзом и формированием атрофического цирроза. Мы полагаем, что основу стеатоза составляет а) высокое содержание в пище С 16:0 пальмитиновой насыщенной жирной кислоты (Пальм н-ЖК), б) усиление эндогенного синтеза ее из углеводов пищи, из глюкозы (ГЛЮ) и в) развитие резистентности к инсулину (ИНС). Оно проявляется в неспособности гормона активировать а) окисление в клетках ГЛЮ и б) синтез из эндогенной Пальм н-ЖК С 18:1 олеиновой моноеновой ЖК. Резистентность к ИНС инициирует патологический процесс на уровне паракринных сообществ клеток; результатом этого является постоянное повышение содержания в межклеточной среде неэтерифицированных ЖК и усиление пассивного поглощения их клетками. Филогенетически древние митохондрии не начнут окислять ГЛЮ, пока в цитозоле присутствуют неэтерифицированные ЖК и есть возможность их окислять. Для устранения нежелательного действия полярной Пальм н-ЖК (реакция пальмиитоилирования) клетки этерифицируют ее со спиртом глицерином в триглицериды, которые депонируют в цитозоле или секретируют в кровь в форме липопротеинов очень низкой плотности. При резистентности к ИНС синтезированная гепатоцитами из ГЛЮ Пальм н-ЖК не превращается далее в олеиновую моно-ЖК; клетки вынуждены этерифицировать эндогенную (экзогенную) Пальм н-ЖК в состав афизиологичных пальмитиновых триглицеридов (Пальм н-ЖК в позиции sn-2 спирта глицерина). При этом формируются триглицериды типа пальмитат-пальмитат-олеат и даже трипальмитат. Температура плавления последнего 48° С; температура плавления физиологичного триолеата — 13° С. Внутриклеточные липазы практически не могут гидролизовать пальмитиновые триглицериды, и перегруженные ими гепатоциты гибнут по типу апоптоза. Формируемые тельца апоптоза нарушают биологическую функцию эндоэкологии и запускают биологическую реакцию воспаления; при этом стеатоз превращается в стеатогепатит. Профилактика стеатоза состоит в резком ограничении в пище содержания Пальм н-ЖК. Лечебное воздействие направлено на снижение образования пальмитиновых триглицеридов путем а) конкурентной этерификации Пальм н-ЖК не в триглицериды, а в фосфатидилхолин (симметричные фосфолипиды сои); б) усиления окисления Пальм н-ЖК в пероксисомах (глитазоны и фибраты) и уменьшения резистентности к ИНС (бинуанид метформин).

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, жирные кислоты, триглицериды, инсулин, резистентность к инсулину.

COMMON FEATURES IN PATHOGENESIS OF INSULIN RESISTANCE AND NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. IMPAIRED METABOLISM OF FATTY ACIDS AND TRIGLYCERIDES

V.N. TITOV, K.V. IVANOVA, P.P. MALYSHEV, S.I. KABA, YU.K. SHIRYAEVA
Russian Cardiology Research Industrial Center, Ministry of Health, Moscow

Summary. Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver (steatosis) remains obscure, as well as apoptotic death of hepatocytes, development of the biological reaction of inflammation and steatohepatitis with subsequent fibrosis and atrophic cirrhosis. We suppose that steatosis is based on a) high dietary content of C 16:0 palmitic saturated fatty acid (Palm s-FA), b) enhanced endogenous production of this FA from dietary carbohydrates, such as glucose (GLU) and c) development of insulin resistance. The latter manifests itself in the lack of ability of the hormone to activate a) GLU oxidation in cells and b) production of C 18:1 oleic monoenoic FA from Palm s-FA. Insulin resistance initiates pathological process at the level of paracrine cell communities, which leads to a constant increase in the concentration of unesterified FA in the intercellular medium and in passive uptake of these FA by cells. Phylogenetically ancient mitochondria do not start GLU oxidation until unesterified FA are present in the cytosol and are available for oxidation. In order to eliminate the undesired effect of polar Palm s-FA cells

esterify it with the alcohol glycerol to triglycerides which are deposited in the cytosol or secreted into blood as very-low-density lipoproteins. In INS resistance, Palm s-FA produced by hepatocytes from GLU is not converted to oleic mono-FA; cells have to esterify endogenous (exogenous) Palm s-FA into nonphysiological palmitic triglycerides (Palm s-FA in sn-2 position of the alcohol glycerol). In this case triglycerides of palmitate-palmitate-oleate type and even tripalmitate type are formed. Melting temperature of the latter is 48°C; melting temperature of physiological trioleate is 13°C. Intracellular lipases practically cannot hydrolyze palmitic triglycerides, and hepatocytes overloaded with them die by apoptosis. The resulting apoptotic bodies impair the biological function of endoecology and trigger the biological reaction of inflammation, i. e., steatosis turns into steatohepatitis. Prevention of steatosis consists in strict limitation of dietary Palm s-FA. Therapy should be aimed at reducing production of palmitic triglycerides by competitive esterification of Pal s-FA to phosphatidylcholine (soybean symmetric phospholipids) but not to triglycerides, increasing Palm s-FA oxidation in peroxisomes (glytozones and fibrates) and reducing INS resistance (binuanide metphormin).

Key words: *nonalcoholic fatty liver, fatty acids, triglycerides, insulin, insulin resistance.*

Данные для корреспонденции:

Титов Владимир Николаевич — д. м. н., профессор,
руководитель лаборатории клинической биохимии липидов и липопротеинов
Института клинической кардиологии
ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Минздравсоцразвития РФ; Москва,
тел. +7(495) 414-63-10, e-mail: vn_titov@mail.ru

С конца XIX века медицина стала чаще встречаться со столь распространенной в настоящее время в популяции человека патологией как ожирение — увеличение массы тела за счет накопления жировой ткани. В XX веке оно приобрело характер «метаболической пандемии». Для понимания этого достаточно обратить внимание на то, что происходило в Китае, стране, которая в течение десятков лет испытывала трудности с продовольствием. С началом экономического роста и улучшения благосостояния жителей широкое экономическое сотрудничество привело к распространению по всей стране предприятий общественного питания типа «фаст-фуд». Прошло десять лет, и в Китае поставлен вопрос о необходимости чуть ли не принудительного лечения детей с ожирением. Ожирение, по нашему мнению, — результат нарушения двух биологических функций: а) биологической функции трофологии (питания), биологической реакции внешнего питания (экзотрофии) и б) биологической функции локомоции, функции движения. Именно становление биологической функции локомоции оказало наиболее выраженное влияние на анатомию и физиологию организма многоклеточных, путем нового, третьего уровня гуморальной и вегетативной регуляции метаболизма — уровня организма [7]. Ожирение является результатом повышения индукции субстратом (пищей) при понижении окисления субстратов в митохондриях при отсутствии интенсивной физической активности.

В филогенезе регуляция метаболизма на уровне организма органично надстроилась над а) филогенетически более ранней гуморальной регуляцией в паракринных сообществах клеток — структурных и функциональных единицах органов и б) над самой ранней в филогенезе аутокринной регуляцией клеток. Все три уровня регуляции *in vivo* функционируют сочетанно в полном

соответствии, мы полагаем, с описанным нами методологическим приемом общей биологии — биологическая «субординация»: сформированные на более поздних степенях филогенеза гуморальные, гормонально-нервно-гуморальные медиаторы органично надстраиваются над ранее существующими уровнями регуляции, функционально с ними сотрудничают, но не в силах оказать влияние на филогенетически более ранние регуляторные системы. Гуморальная регуляция с уровня организма не может вмешиваться в те процессы, которые регулированы локально на уровне паракринных сообществ клеток. В той же степени паракринный уровень не может повлиять на аутокринную регуляцию в каждой из клеток. Это в полной мере соответствует и еще одному описанному нами методологическому принципу — принципу преемственности при становлении в филогенезе биологических функций и биологических реакций, органов и систем [8]. Эволюционный процесс *in vivo* чаще происходит не путем создания чего-то совсем нового, а путем длительного совершенствования того, что сформировано на более ранних ступенях филогенеза. Реакции метаболизма, которые формируются на уровне организма, при становлении филогенетически поздней биологической функции локомоции, несомненно, более совершенны, более производительны по сравнению с более ранними, но и они не лишены недостатков. Вот эти-то недостатки регуляции на уровне организма и являются, по нашему мнению, основой патогенеза наиболее распространенных в патологии человека заболеваний, таких как атеросклероз, ожирение, сахарный диабет, метаболический синдром, эссенциальная артериальная гипертония и неалкогольная жировая болезнь печени. Единение патогенеза этих заболеваний состоит в том, что все они включают нарушения метаболизма жирных кислот (ЖК). Если частота распространения заболевания

в популяции превышает 5–7%, основу патогенеза его составляет, мы полагаем, нарушение одной из биологических функций.

Наиболее частыми последствиями нарушения биологической функции трофологии (питания) и особенностями «вестерн диеты» являются ожирение и синдром резистентности к инсулину (РЕЗ к ИНС). Это часто приводит к накоплению ЖК в форме триглицеридов (ТГ) в цитозоле филогенетически поздних ИНС-зависимых гепатоцитов, β -клеток островков Лангерганса и кардиомиоцитов. Поначалу развивается процесс избыточного накопления в клетках ТГ; далее формируется патологическое состояние стеатоза печени. Далее, когда перегруженные афизиологичными ТГ клетки начинают гибнуть по типу апоптоза, тельца апоптоза становятся в межклеточной среде биологическим «мусором», происходит нарушение биологической функции эндоэкологии — «чистоты» межклеточной среды. Для этого в паракринных сообществах и на уровне организма происходит формирование биологической реакции воспаления. Со времен И.И. Мечникова поглощение (фагоцитоз) и утилизацию эндогенного (экзогенного) биологического «мусора» функциональными фагоцитами — нейтрофилами и оседлыми макрофагами мы именуем биологической реакцией воспаления. При формировании эндогенного, асептического воспаления стеатоз печени постепенно превращается в стеатогепатит с развитием выраженной лимфоидной инфильтрации, недостаточности функции печени, фиброза и далее атрофического цирроза печени. В США 14% трансплантаций печени проводят по причине стеатогепатита, логичным продолжением которого является атрофический цирроз печени [17]. В популяции США при использовании метода магнитно-резонансной спектроскопии (томографии) печени у пациентов с метаболическим синдромом стеатоз выявлен более чем в 40% случаев. При обследовании детей с ожирением обнаруживается, что увеличение отложения ТГ в печени часто и быстро прогрессирует. Какие же нарушения метаболизма ЖК и ТГ являются причиной стеатоза печени и далее развития стеатогепатита?

Неалкогольная жировая болезнь печени (стеатоз) включает а) накопление ТГ в цитозоле гепатоцитов в форме липидных капель (стеатоз), б) присоединение биологической реакции воспаления с развитием стеатогепатита, далее происходит формирование в) фиброза и г) атрофического цирроза печени. В США это наиболее частая причина нарушения функции печени; им страдает более 30 миллионов человек. Наиболее частым нарушением *in vivo* при стеатозе является РЕЗ к ИНС; полагают, что стеатоз может быть и компонентом метаболического синдрома. Выказано мнение о двух основных факторах становления патологии и прогрессирования заболевания: 1 — накопление ЖК в цитозоле гепатоцитов в форме неполярных ТГ и 2 — гибель клеток по типу апоптоза с нарушением биологической

функции эндоэкологии, активацией биологической реакции воспаления и морфологической картиной неалкогольного стеатогепатита. Частота стеатоза в популяциях составляет 14–24%; заболевают, как правило, взрослые. Наиболее часто заболевание сопровождается ожирением, РЕЗ к ИНС и развитием диабета второго типа [17].

Накопление ЖК в форме ТГ в цитозоле гепатоцитов происходит соответственно биохимическим процессам, часть из которых приведена на рисунке 1. Причиной РЕЗ к ИНС гепатоцитов, как и иных ИНС-зависимых клеток, является повышение в межклеточной среде содержания полярных, неэтерифицированных ЖК (НЭЖК), которые между клетками переносят липид-транспортный белок альбумин (АЛБ) в комплексах АЛБ+НЭЖК. Клетки пассивно поглощают НЭЖК путем диффузии через плазматическую мембрану по градиенту концентрации межклеточная среда → цитозоль. При поступлении НЭЖК в цитозоль митохондрии сразу начинают их окислять, при этом они конкурентно останавливают окисление глюкозы (ГЛЮ). Это не имеет отношения к циклу Рендла [45] (цикл ГЛЮ ↔ НЭЖК); этот цикл функционирует только на аутокринном уровне при недостатке в цитозоле одного из субстратов — ГЛЮ или ЖК. К формированию синдрома РЕЗ к ИНС, к нарушению регуляции на уровне организма цикл Рендла отношения не имеет.

Если мы, с учетом физико-химических условий, которые, можно полагать, существовали на ранних ступенях филогенеза, расставим все субстраты окисления митохондриями в порядке уменьшения константы скорости реакции, образования ацетил-КоА и синтеза АТФ в цикле Кребса, получится последовательность:

1. Кетоновые тела (КТ) — метаболиты самой короткой С 4 масляной ЖК — бутирата: β -гидроксибутират, ацетоацетат и ацетон;
2. Короткоцепочечные С 6 — С 10 н-ЖК;
3. Среднецепочечные С 12 и С 14 н-ЖК;
4. Длинноцепочечная С 16:0 пальмитиновая (Пальм) н-ЖК, для которой во внутренней мембране митохондрии имеют специфичный транспортер карнитин-пальмитоил ацилтрансферазу; далее
5. ω -9 эндогенная и ω -6 экзогенная С 18:1 олеиновая моно-ЖК, которая при наличии двойной связи (-C=C-) в цепи имеет высокую константу скорости окисления [2], по сравнению с Пальм н-ЖК; последней в ряду окисления субстратов оказывается
6. ГЛЮ.

Становление этой последовательности, можно полагать, произошло на ранних ступенях филогенеза еще в митохондриях прокариотов (безъядерных клеток), и, согласно методологическому приему «биологической субординации» и биологическим «запретам» эволюции [5], эти особенности изменения не подлежат. Митохондрии начнут окислять ГЛЮ при условии, что

в цитозоле клеток нет субстратов с более высокой константой скорости окисления.

При усилении пассивного поглощения клетками НЭЖК и появлении их в цитозоле митохондрии останавливают окисление ГЛЮ и происходит повышение ее концентрации в цитозоле, которая физиологично всегда несколько ниже, чем в межклеточной среде. Гидрофильная ГЛЮ не может диффундировать через гидрофобную плазматическую мембрану, и ее пассивно (по градиенту концентрации) переносят в цитозоль глюкозные транспортеры, от филогенетически раннего ГЛЮТ1 до позднего, ИНС-зависимого ГЛЮТ4. При понижении окисления в митохондриях клетки уменьшают и пассивное поглощение ГЛЮ из межклеточной среды с формированием гипергликемии и далее компенсаторной гиперинсулинемии. Синдром РЕЗ к ИНС формируется во всех ситуациях *in vivo* на уровне организма, когда филогенетически поздний ИНС не может:

а) заблокировать липолиз в клетках рыхлой соединительной ткани (РСТ) филогенетически ранних паракринных сообществ, в которых его локально активируют филогенетически ранние гуморальные медиаторы (тиреоидные, соматотропный гормон, катехоламины и глюкокортикоиды);

б) понизить содержание в межклеточной среде АЛБ+НЭЖК;

в) остановить пассивное поглощение клетками НЭЖК и

г) предотвратить этим блокаду окисления митохондриями ГЛЮ.

Если в каких-то паракринных сообществах *in vivo* длительно будет происходить

а) усиление липолиза в интерстициальных клетках РСТ при действии локальных гормонов, активация гормон-зависимой липазы и освобождение из триглицеридов НЭЖК или

б) формирование локального очага биологической реакции воспаления и мобилизации НЭЖК из клеток РСТ,

это приведет к повышению в межклеточной среде содержания АЛБ+НЭЖК и формированию краткого (длительного) синдрома РЕЗ к ИНС.

Синдром РЕЗ к ИНС характеризуют:

а) постоянно повышенное содержание в межклеточной среде (плазме крови) АЛБ+НЭЖК и пассивное усиленное поглощение клетками НЭЖК по градиенту концентрации;

б) компенсаторная гиперинсулинемия, которая имеет целью все-таки заблокировать липолиз в клетках РСТ паракринных сообществ;

в) активация синтеза в гепатоцитах гликогена;

г) усиление липогенеза — синтеза Пальм н-ЖК из того количества ГЛЮ, которое клетки не окислили в митохондриях при наличии в цитозоле НЭЖК. По сути, при синдроме РЕЗ к ИНС всю ГЛЮ, которую не окислили митохондрии, клетки используют в реакциях

липогенеза, в синтезе Пальм н-ЖК. Это соответствует биологической роли ИНС — обеспечению субстратами энергии биологической функции локомоции. И не стоит говорить, сколь много функций выполняет *in vivo* ИНС; он выполняет только одну эту биологическую функцию. В то же время, реализация ее является многогранной, в первую очередь по причине наличия двух субстратов для синтеза АТФ — НЭЖК и ГЛЮ. Однако даже выраженная гиперинсулинемия не может ингибировать активность гормон-зависимой липазы в РСТ паракринных сообществ; филогенетически ранние клетки не чувствительны к действию филогенетически позднего ИНС; у них нет рецепторов.

В то же время ИНС-зависимые, филогенетически поздние скелетные миоциты, адипоциты, гепатоциты и β-клетки островков реагируют на гиперинсулинемию и усиливают функциональную активность. По сути, РЕЗ к ИНС есть краткое (патофизиологичное) или длительное (патологическое) функциональное несоответствие регуляторных процессов на уровне паракринных сообществ и уровне организма. *In vivo* ИНС может регулировать реакции метаболизма только в ИНС-зависимых клетках. РЕЗ к ИНС развивается в период реализации биологической реакции экзотрофии, при постпрандиальной гиперлипидемии и гипергликемии при высоком уровне секреции β-клетками ИНС. Секреции ИНС практически нет в период реализации биологической реакции эндотрофии.

Что же мы выясняем, проводя тест толерантности к ГЛЮ? По сути, мы определяем наличие или отсутствие РЕЗ к ИНС. Вводя ГЛЮ *per os*, мы инициируем

а) быструю секрецию ИНС, запасенного в β-клетках островков;

б) блокаду липолиза, прекращение освобождения из клеток НЭЖК, снижение содержания их в межклеточной среде, блокаду β-окисления ЖК и образование КТ и

в) активацию окисления митохондриями ГЛЮ. У тех пациентов, у которых ИНС все это сделать способен, митохондрии быстро окисляют введенную ГЛЮ и депонируют ее в форме гликогена в цитозоле. Клетки при активации ИНС, но все-таки пассивно поглощают ГЛЮ через ГЛЮТ4, и уровень ее в межклеточной среде (плазме крови) в течение 2 час. возвращается к исходному. Если же ИНС не может заблокировать липолиз и понизить содержание АЛБ + НЭЖК в межклеточной среде и цитозоле, митохондрии клеток продолжают в цикле Кребса окислять НЭЖК, и снижение уровня ГЛЮ в плазме крови (окисление ГЛЮ) происходит медленно. В тесте толерантности к ГЛЮ мы определяем, в какой степени ИНС физиологично регулирует процессы метаболизма, в первую очередь, ЖК и во вторую — ГЛЮ.

Основное различие в использовании ИНС-зависимыми клетками субстратов для образования ацетил-КоА и синтеза АТФ в цикле Кребса состоит в том, что

- при физиологичном действии ИНС клетки окисляют ГЛЮ, усиливают синтез гликогена и «экономят» ЖК, запасая их в адипоцитах;
- при РЕЗ к ИНС клетки окисляют ЖК, а ГЛЮ используют для а) образования гликогена и б) синтеза de novo Пальм н-ЖК. Далее синтезированной (эндогенную) Пальм н-ЖК клетки в норме превращают в олеиновую моно-ЖК, формируя олеиновые ТГ.

Чем более выражена РЕЗ к ИНС, чем больше ГЛЮТ4, при действии ИНС, находятся на плазматической мембране и усиливают поглощение ГЛЮ при блокаде ее окисления в митохондриях, тем больше клетки используют поглощенную ГЛЮ в синтезе Пальм н-ЖК, образовании ТГ и их депонировании в цитозоле. При этом запасание ТГ происходит в ИНС-зависимых клетках, которые для этого не предназначены: в гепатоцитах, кардиомиоцитах и β -клетках островков Лангерганса.

Синдром РЕЗ к ИНС не означает, что

- происходят нарушения в первичной структуре ИНС, регуляции его синтеза и секреции;
- имеется несостоятельность каскада передачи сигнала ИНС в клетку;
- нарушено выставление на мембрану ИНС-зависимых ГЛЮТ4 или
- изменены метаболические превращения ГЛЮ в клетке.

Подобные нарушения происходят при диабете первого типа и при врожденных формах диабета второго типа; их мы рассматриваем как структурно-зависимые формы РЕЗ к ИНС. В подавляющем же числе наблюдений РЕЗ к ИНС является функциональной. Она является результатом неспособности ИНС нормализовать функциональные нарушения, которые развиваются в филогенетически ранних паракринных сообществах, на которые ИНС влиять не может. Одновременно в полной мере ИНС действует на филогенетически поздние ИНС-зависимые клетки. Это функциональное несоответствие действия ИНС — невозможность активировать окисление ГЛЮ и усиление синтеза ЖК из ГЛЮ — и составляет основу липоидоза. При РЕЗ к ИНС липоидоз развивается во всех ИНС-зависимых клетках: в гепатоцитах в форме неалкогольной жировой болезни печени (стеатоза), в кардиомиоцитах в форме дилатационной кардиомиопатии и в адипоцитах, вероятно, в форме избирательного накопления ТГ в отдельных жировых депо [22]. Афизиологичное запасание ТГ в клетках, которые для этого не предназначены, именуют «липотоксичностью».

В физиологичных условиях эндотрофии, когда гепатоциты пассивно поглощают повышенное количество НЭЖК, они этерифицируют их в ТГ, далее апоВ-100 структурирует ТГ в состав липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), после чего гепатоциты секретируют ЛПОНП во внутрисосудистую среду. Эти ЛПОНП мы определяем при электрофорезе ЛП в сыворотке кро-

ви пациентов натошак. Избыточное количество ГЛЮ гепатоциты используют в синтезе С 16:0 пальмитиновой насыщенной ЖК (Пальм н-ЖК), в липогенезе. Происходит это путем экспрессии ИНС тех генов, которые усиливают синтез ферментов липогенеза (рис. 1), в первую очередь синтазы ЖК. Именно синтаза ЖК осуществляет многоэтапное образование in situ из ГЛЮ (из ацетил-КоА) С 16:0 Пальм н-ЖК. Гепатоциты, как и все клетки, могут из ГЛЮ синтезировать только Пальм н-ЖК. Далее, при экспрессии генов пальмитоилэлонгазы ИНС активирует превращение 16:0 Пальм н-ЖК в С 18:0 стеариновую н-ЖК, а при экспрессии генов стеаторилдесапуразы активирует введение в цепь стеариновой н-ЖК двойной связи (-C=C-) с образованием С 18:1 ω -9 олеиновой моноеновой ЖК (моно-ЖК) [26]. При усилении окисления митохондриями НЭЖК происходит: а) активация синтеза карнитин-пальмитоил ацилтрансферазы, транспортера, который переносит ЖК через внутреннюю мембрану митохондрий, а также б) усиление синтеза большого семейства белков, которые переносят ЖК в цитозоле от мембраны клеток к пероксисомам и митохондриям.

После синтеза из ГЛЮ или пассивного поглощения экзогенной Пальм н-ЖК и олеиновой моно-ЖК гепатоциты могут: а) окислить ЖК в митохондриях с целью синтеза АТФ или б) этерифицировать с трехатомным спиртом глицерином с образованием ТГ. Последние можно а) депонировать в цитозоле в форме липидных капель или б) секретировать в межклеточную среду через каналы эндоплазматической сети. При реализации второго варианта апополипротеин апоВ-100 и микросомальный белок, переносящий ТГ, вместе формируют ЛПОНП. При семейной абетаполипротеинемии, когда в плазме крови мало ЛПОНП, причиной этого является мутация микросомального белка, переносящего ТГ [54], а не недостаток апоВ-100. Дефект какого же протеина может быть причиной накопления ТГ в гепатоцитах и формирования стеатоза? Является ли формирование липоидоза гепатоцитов первичным или оно вторично? Образование стеатоза ли предшествует синдрому РЕЗ к ИНС или стеатоз является следствием РЕЗ к ИНС?

При развитии стеатоза у человека и мышей в гепатоцитах накапливается избыток С 18:1 олеиновой моно-ЖК, самой длинной из ЖК, которую в реакциях липогенеза могут синтезировать животные клетки [47]. Синтез ЖК из ГЛЮ регулируют сами клетки на раннем аутокринном уровне; в клетках синтез Пальм н-ЖК не зависит от ИНС, но определен и содержанием субстрата — уровнем гликемии в межклеточной среде. Филогенетически поздний ИНС активирует липогенез на транскрипционном уровне, используя локализованный на мембране ИНС-зависимых клеток фактор транскрипции — стерол регуляторный элемент связывающий протеин. Он представлен в форме изоформ из семейства факторов транскрипции [16]. После связывания с ре-

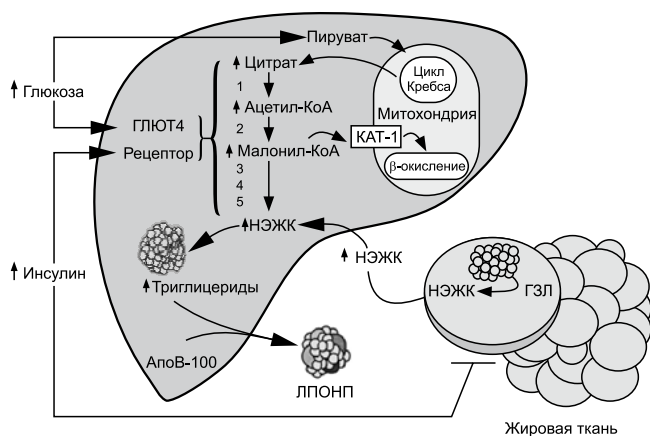


Рис. 1. Мобилизация АЛБ+НЭЖК из адипоцитов и метаболические превращения ЖК в гепатоцитах (окисление в митохондриях, синтез ЖК de novo, запасание в цитозоле и секрция в форме ТГ в составе ЛПОНП). КАТ-1 — карнитин-пальмитоил ацилтрансфераза-1; ГЗЛ — гормон-зависимая липаза; 1 — ацетил-КоА-цитрат лиаза; 2 — ацетил-КоА карбоксилаза; 3 — синтеза ЖК; 4 — пальмитоил-КоА элонгаза; 5 — стеарил-КоА десатураза

цепторами на мембране ядра фактор экспрессирует в клетках синтез ферментов липогенеза. Если у трансгенных животных вызвать гиперэкспрессию стерол регуляторного элемент связывающего белка, формируется стеатоз печени при усилении липогенеза [17]. У грызунов при этом развиваются РЕЗ к ИНС, гиперинсулинемия и ожирение. Заметим, что при синдроме РЕЗ к ИНС гормон продолжает усиливать в печени синтез ЖК de novo.

Взаимоотношение субстратов в формировании в клетках двух пулов ацетил-КоА (из ГЛЮ и НЭЖК) регулировано на аутокринном уровне. В физиологичных условиях ГЛЮ в клетке может быть использована в синтезе ЖК или превращена в пируват, далее ацетил-КоА и окислена в цикле Кребса с образованием АТФ (рис. 1). Первым этапом цикла Кребса является взаимодействие ацетил-КоА со щавелевой кислотой (оксалацетатом) с образованием цитрата (лимонной кислоты). Цитрат, образованный в цикле Кребса, может выходить из митохондрий в цитозоль, где его АТФ-цитрат лиаза превращает в ацетил-КоА. Далее ацетил-КоА карбоксилаза-1 удлинняет С 2 ацетил-КоА в более длинные С 4 ацетоацетил-КоА и далее С 6 малонил-КоА, который клетки удлиняют в синтезе Пальм н-ЖК. Ранее мы показали, что меченые предшественники [¹⁴С]ацетат и [³Н] лейцин голодные животные используют в синтезе ГЛЮ, а сытые крысы — в синтезе ЖК [4]. При формировании стеатоза в гепатоцитах происходит накопление и конечного продукта синтеза ЖК in vivo — олеиновой моно-ЖК. Синтез ЖК в гепатоцитах усилен и при синдроме РЕЗ к ИНС.

Используя факторы транскрипции, ИНС активирует не только ацетил-КоА карбоксилазу-1, но и ее изофермент-II [29]; он также образует малонил-КоА, но не в цитозоле, а в мембране митохондрий, и понижает

окисление ЖК путем ингибирования активности карнитин-пальмитоил ацилтрансферазы. Если у крыс выбить ген ацетил-КоА карбоксилазы-II, они становятся резистентными к ожирению по причине постоянно усиленного окисления ЖК. Экспрессированная аденовирусом малонил-КоА декарбоксилаза и деструкция малонил-КоА повышает β-окисление ЖК в митохондриях и понижет накопление ТГ в гепатоцитах. Используя иной фактор транскрипции, углеводы и ГЛЮ стимулируют липогенез; фактор именуют углеводный регулирующий элемент связывающий белок. Он после активации глюкозой связывается с рецепторами на мембране ядра и активирует синтез транскрипционной ДНК. ГЛЮ может при действии иного фактора транскрипции активировать в гепатоцитах пируваткиназу — ключевой фермент гликолиза. Она в печени превращает фосфоэнолпируват в пируват, который далее в форме ацетил-КоА включается в цикл Кребса. В реакции с оксалацетатом он образует цитрат, который в цитозоле превращается в малонил-КоА и становится субстратом для синтеза ЖК. Экспрессия пируваткиназы гепатоцитов понижает синтез ЖК [36].

Еще одним фактором транскрипции и формирования стеатоза печени у грызунов является рецептор активации пролиферации пероксисом-γ. Это член семейства гормональных рецепторов на мембране ядра, который необходим, в частности, для дифференцировки адипоцитов и запасаания ими ТГ. В условиях физиологии экспрессия рецептора происходит в малой степени, однако при моделировании РЕЗ к ИНС в печени она выражено возрастает. Участвует рецептор и в реализации действия стерол регуляторного элемент связывающего протеина, который, вероятно, является лигандом для этого рецептора [23]. Однако не удалось выявить экспрессию этого белка в ткани печени у пациентов со стеатозом.

Активированная циклическим аденозинмонофосфатом протеинкиназа является в клетках сенсором продукции АТФ. Активность ее повышается при увеличении содержания ц-аденозинмонофосфата в цитозоле клеток — маркера сниженного синтеза АТФ. В этих условиях активировано β-окисление ЖК и снижена активность липогенеза [43]. Клинические наблюдения показали, что пролифераторы пероксисом пиоглитазон и розиглитазон уменьшают явления стеатоза печени [44]. Повышение липогенеза в печени составляет основу стеатоза печени — накопления ТГ в гепатоцитах в условиях РЕЗ к ИНС. Возможно также, что усиление образования в митохондриях малонил-КоА приводит к уменьшению β-окисления ЖК. Вместе с тем, концепция активации эндогенного синтеза ТГ в гепатоцитах и все механизмы ее развития основаны на экспериментах, которые проведены на мышах. Использование метода стабильных изотопов в клинике показало, что при стеатозе усиление синтеза ЖК и образование ТГ de novo действительно происходит, но в меньшей степени, чем у грызунов.

И хотя синтез ЖК в гепатоцитах человека при РЕЗ к ИНС действительно повышен, это не является основной причиной стеатоза.

Результаты экспериментов, особенно с грызунами, в сопоставлении с наблюдениями на пациентах, следует оценивать осторожно. Это определено существенными различиями метаболизма ЖК. Если в качестве ЭС поли-ЖК человеку необходима только ω -6 С 20:4 арахидоновая поли-ЖК, то крысам достаточно получать с пищей С 18:2 линолевую нена-ЖК, из которой они синтезируют последовательно γ -линоленовую, дигомо- γ -линоленовую и Арахид ЭС поли-ЖК. В эксперименте не удается воспроизвести особенности становления стеатоза и стеатогепатита у человека [52]. Морфологическая картина биоптатов печени при неалкогольной жировой болезни и при алкогольном гепатите практически одинакова. Патологические механизмы «замусоривания» межклеточной среды эндогенными флогогенами (инициаторами биологической реакции воспаления) также одинаковы. При выраженном стеатозе и перегрузке гепатоцитов ТГ происходит их гибель по типу апоптоза. Образующие тельца апоптоза «замусоривают» межклеточную среду, нарушают биологическую функцию эндоэкологии и инициируют биологическую реакцию воспаления — утилизацию телец апоптоза функциональными фагоцитами, оседлыми макрофагами и моноцитами гематогенного происхождения, которые становятся макрофагами.

Для того, чтобы компоненты комплемента опсонизировали тельца апоптоза и поглотили макрофаги, их, как и все эндогенные флогогены, физиологично денатурировать. Реализуют это нейтрофилы путем синтеза и секреции в межклеточную среду активных форм кислорода (АФК), которые путем окисления формируют на тельцах апоптоза афизиологичные эпитопы. Функционально продукция АФК и физиологичная денатурация эндогенных флогогенов (инициаторов воспаления) и есть первый этап биологической реакции воспаления. Так, при нарушении биологической функции эндоэкологии и становлении биологической реакции воспаления происходит превращение стеатоза в стеатогепатит. Макрофаги в биологической реакции воспаления (синдроме системного воспалительного ответа) начинают синтез первичных (про- и противовоспалительные цитокины) и далее вторичных медиаторов биологической реакции воспаления — белков острой фазы. Избыточное количество нарабатанных нейтрофилами АФК инактивируют эндогенные «захватчики», основными из которых являются ω -9 С 18:1 олеиновая моно-ЖК, мочевая кислота и компоненты общей антиокислительной системы межклеточной среды. β -окисление в митохондриях ЖК является основой синтеза *in vivo* АТФ. Имеются доказательства того, что при стеатозе нарушена функция митохондрий; отмечены и изменения в структуре органелл [19]. Такие же изменения найдены при введении препарата, который прерывает дыхательную

цепь митохондрий. Одновременно в пероксисомах происходит усиление не только β -, но ω - и α -окисления афизиологичных ЖК. Это же можно наблюдать и при лечении пациентов со стеатозом агонистами рецепторов пролиферации пероксисом на мембране ядер гепатоцитов — глитазонами, фенофибратами, липоевой (тиоктовой) н-ЖК и ω -3 ЭС поли-ЖК; при этом действие ω -6 ЭС поли-ЖК менее выражено.

Большинство пациентов со стеатозом имеют повышенный индекс массы тела (10–40%) и гипертриглицеридемию с увеличением пре β -ЛП (ЛПОНП) на электрофореграмме. При этом содержание апоЕ увеличено в апоВ-100 ЛП; в ЛПОНП в ТГ этерифицированы, главным образом, олеиновая моно-ЖК и Пальм н-ЖК. Патологический процесс начинается с накопления в гепатоцитах избытка ТГ с развитием РЕЗ к ИНС. Может ли РЕЗ к ИНС быть локальной и формироваться первично в одном органе или ткани? Вероятно, так оно и происходит [53]. Мы полагаем, что при синдроме РЕЗ к ИНС в полной мере сохранены все стороны действия ИНС в ИНС-зависимых клетках в реализации его биологической роли. Причиной же РЕЗ к ИНС является формирование патологических процессов в филогенетически ранних паракринных сообществах, в которых гуморальные медиаторы активируют гормон-зависимую липазу в клетках РСТ и повышают в межклеточной среде содержание АЛБ + НЭЖК. Это усиливает поглощение НЭЖК всеми, в том числе и ИНС-зависимыми клетками по градиенту концентрации путем пассивной диффузии НЭЖК через плазматическую мембрану. В цитозоле, согласно особенностям древних митохондрий, НЭЖК конкурентно останавливают окисление ГЛЮ. При этом филогенетически поздний ИНС не может нормализовать афизиологичные процессы в филогенетически ранних паракринных сообществах, те процессы, которые блокируют способность ИНС усиливать окисление ГЛЮ. Все это нежелательно, но, по сути, соответствует положениям общей биологии. Синдром РЕЗ к ИНС — это физиологичное действие ИНС в ИНС-зависимых клетках в условиях повышенного содержания в цитозоле НЭЖК и блокады окисления ими ГЛЮ.

Полярная Пальм н-ЖК в форме НЭЖК в цитозоле проявляет свойства «цитотоксичности». Будучи выражено гидрофобной и химически активной, Пальм н-ЖК, как и ГЛЮ, ковалентно взаимодействует с аминокислотными остатками белков (реакция пальмитоилирования), нарушая их конформацию и функциональные свойства; кроме того, Пальм н-ЖК ингибирует экспрессию генов ИНС [27]. Поэтому клетки активно этерифицируют ее в состав ТГ, но пальмитиновых ТГ (Пальм н-ЖК в sn-2 спирта глицерина), вплоть до образования трипальмитата. Этерификацию Пальм н-ЖК в ТГ в ИНС-зависимых клетках рассматривают как реакцию детоксикации Пальм н-ЖК; в форме ТГ она становится неактивной [21]. Однако формируются пальмитиновые ТГ типа пальмитат-пальмитат-олеат или наи-

более нежелательные ТГ — трипальмитат; температура плавления последних составляет 48° С. Это не позволяет липазам *in vivo* осуществить их гидролиз в клетках; заметим, что температура плавления ТГ типа олеат-олеат-олеат (триолеата) составляет 13° С. По сути, активируя реакции этерификации, клетки устраняют «цитотоксичность» Пальм НЭЖК, но формируют «цитотоксичность» пальмитиновых ТГ. Такие ТГ накапливаются в цитозоле гепатоцитов, кардиомиоцитов [20], адипоцитов и β-клеток островков поджелудочной железы. При выраженном накоплении пальмитиновых ТГ в цитозоле гепатоцитов клетки начинают выводить ТГ за плазматическую мембрану, реализуя биологическую реакцию экзоцитоза. Выведение неполярных ТГ именуют шеддингом (отторжением); таким же способом макрофаги в интима артерий избавляются от избыточного количества неэтерифицированного спирта ХС, формируя кристаллы моногидрата ХС и выводя их в межклеточную среду.

На аутокринном уровне запасание ТГ вне клеток физиологично; оно является прообразом филогенетически раннего биологического внеклеточного пищеварения. На ранних ступенях филогенеза, при отсутствии у одноклеточных системы пищеварения, клетки эндоцитозом выводили протеолитические ферменты за пределы плазматической мембраны, вне клеток происходил гидролиз экзогенных субстратов, после чего путем эндоцитоза клетки поглощали гидролизат. За пределами клеток гидрофобные ТГ, располагаясь на наружной поверхности мембраны, остаются физиологично активными, и при необходимости клетки могут их использовать. У свиней на поверхности гепатоцитов всегда располагаются ТГ. Избыточное накопление афизиологичных пальмитиновых ТГ в цитозоле и вне гепатоцитов (в межклеточной среде) становится причиной гибели клеток по типу апоптоза. Наличие афизиологичных ТГ на поверхности плазматической мембраны адипоцитов мешает взаимодействию клеток с межклеточной средой, нарушая биологические функции гомеостаза и эндоэкологии. Гибель клеток и образование телец апоптоза нарушает биологическую функцию эндоэкологии. При этом толл-рецепторы клеток РСТ, которые дифференцируют все белки по принципу «свой — не свой», признают их «не своими» и активируют биологическую реакцию воспаления. Гибель гепатоцитов по типу апоптоза, «засорение» межклеточной среды эндогенными флогогенами (инициаторами воспаления) в форме телец апоптоза и является причиной превращения стеатоза в стеатогепатит.

Вероятно, после становления биологической функции локомоции и системы ИНС на последующих ступенях филогенеза произошло совершенствование регуляции жировой ткани на уровне организма. Среди причин, которые инициировали эндокринную функцию жировой ткани, возможно, была и необходимость не допустить формирования РЕЗ к ИНС на уровне организма

ни в одном из специализированных жировых депо, которые предназначены для обеспечения энергией биологической функции локомоции. Это привело к совершенствованию действия ИНС и регуляции метаболизма в жировой ткани [11]. В функциональной активности гуморальной системы регуляции, которая сформировалась на столь поздних ступенях филогенеза, необходимо детально разобраться, как в ее взаимодействии с вегетативной иннервацией, как и с особенностями развития липодистрофии. Продукты гена ADIPOQ — адипоцитокнины, адипокины, *adipose derived hormones* — гуморальные медиаторы начали, как и ИНС, функцию на уровне организма [1]. Вероятно, это те гуморальные медиаторы, которые задействованы в регуляции метаболизма энергетических субстратов — ГЛЮ и ЖК, но на уровне организма.

Жировую ткань рассматривают не только как жировое депо: это орган регуляции метаболизма на уровне организма. Гуморальные медиаторы синтезируют по-разному как мезентериальные, висцеральные адипоциты белой жировой клетчатки сальника и забрюшинного пространства, так и подкожной жировой ткани. При избыточной массе тела происходит не только гипертрофия, но и пролиферация адипоцитов; при этом активность малых адипоцитов более высокая, по сравнению с большими. Однако какие же факторы, кроме высокого содержания физиологичных и афизиологичных ЖК в пище, могут инициировать синдром РЕЗ к ИНС? Возможно, это гуморальные медиаторы клеток самой молодой *in vivo* жировой ткани. Назвали их адипоцитокнинами: *adipo* — жир, *cyto* — клетка, *kinos* — движение, адипокинами; это лептин, адипонектин и резистин. С этим соглашаются не все, поскольку цитокинами именуют гуморальные медиаторы, которые регулируют взаимодействия между клетками в иммунных реакциях [12]. Первым открыли лептин (от греч. *leptos* — тонкий); у мышей с ожирением выявили мутацию гена, который экспрессирует синтез лептина. После введения лептина у мышей понизилась масса тела. У человека адипоциты подкожной жировой клетчатки синтезируют в два раза больше лептина, чем висцеральные, мезентериальные адипоциты [42]. Лептин действует в гипоталамусе на центры голода и насыщения и контролирует массу тела путем высвобождения нейропептида Y, пептида голода [37]. Секреция лептина, как и иных адипокинов, происходит циклично; максимум — примерно в полдень, а минимальные значения — в 23–3 часа ночи [6]. Полагают, что при функциональной РЕЗ гипоталамических центров к лептину развивается ожирение или что-то мешает его действию; далее компенсаторно развивается гиперлептинемия в межклеточной среде, вероятно, как и гиперинсулинемия. У крыс с ожирением и РЕЗ к ИНС снижено число рецепторов к лептину на мембране клеток ядер гипоталамуса [32].

В клинике выявлена позитивная зависимость между содержанием лептина в плазме крови и РЕЗ к ИНС с учетом изменения количества жировой ткани *in vivo*.

Лептин может быть связующим звеном между адипоцитами и β -клетками поджелудочной железы, и возможно, что именно он инициирует гиперинсулинемию при РЕЗ к ИНС [34]. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показали, что лептин отчасти является и ростовым фактором: он стимулирует ангиогенез, пролиферацию гемопоэтических клеток и β -клеток поджелудочной железы [48]. Лептин стимулирует иммунный ответ клеток, влияет на продукцию провоспалительных цитокинов. Однако не все данные являются столь уж однозначными. Синтез лептина стимулирует активация симпато-адреналовой системы; катехоламины же подавляют продукцию лептина. При метаболическом синдроме эти взаимоотношения оказываются нарушенными. Повышение секреции адипоцитами лептина может быть ассоциировано с формированием РЕЗ к ИНС, усилением стеатоза и далее стеатогепатита.

Из жировой ткани выделен и иной сигнальный липид — гликопротеин адипонектин [3]. Он является адипокином, и синтез его экспрессируют клетки подкожной жировой клетчатки в большей мере, чем висцеральные адипоциты [46]. Адипонектин секретируют клетки в большем количестве, чем иные адипокины [30]; полимерные формы адипонектина биологической активностью не обладают. Экспрессия, секреция и уровень в плазме крови адипонектина понижаются при ожирении; чем больше *in vivo* число адипоцитов, тем меньше они секретируют адипонектина. Объясняют это действием ингибиторов экспрессии синтеза адипонектина, который продуцируют также клетки жировой ткани. Такими ингибиторами являются провоспалительный цитокин — фактор некроза опухоли- α , а также глюкокортикоиды и катехоламины, повышение содержания которых снижает синтез адипонектина [13]. Уровень адипонектина коррелирует с чувствительностью тканей к ИНС; гипоадипонектинемия инициирует РЕЗ к ИНС и стеатоз печени. В эксперименте адипонектин тормозит дифференцировку преадипоцитов и формирование клеток жировой ткани. У индейцев племени Пима, среди которых высока частота ожирения и диабета, в плазме крови снижено содержание адипонектина. Это негативно коррелирует с чувствительностью тканей к ИНС [38]. Адипонектин усиливает поглощение клетками ГЛЮ и окисление ЖК в гепатоцитах путем активации ц-АМФ зависимой киназы [56], способствуя реализации действия ИНС. Уровень адипонектина снижается при ожирении, в то время как содержание иных адипокинов повышается, включая лептин, резистин и фактор некроза опухоли- α . В противоположность этому, высокий уровень адипонектина в плазме крови является фактором, который уменьшает вероятность развития диабета второго типа и инфаркта миокарда. *In vivo* и *in vitro* показано протективное действие адипонектина в отношении атеросклероза и атероматоза, фиброзного поражения ИНС-зависимых клеток и биологической реакции воспаления [40].

Адипоциты, точнее, клетки жировой ткани синтезируют и такой адипокин как резистин, вероятный фактор РЕЗ к ИНС. Это богатый цистеином белок, который представлен несколькими изомерами; в плазме крови присутствует в форме гомодимера [50]. При инкубации адипоцитов с ротглитазоном — агонистом рецепторов активации пролиферации пероксисом- γ синтез адипонектина понижался. Повышение резистина в плазме крови может способствовать формированию диабета и ожирения [51]. К адипокинам относят и 28-аминокислотный пептид грелин, уровень которого увеличивается при голодании, снижении массы тела, изменении калорийности пищи и гипогликемии. Повышение содержания грелина в плазме крови после снижения массы тела согласуется с гипотезой, что пептид задействован в регуляции массы жировой ткани [35].

При стеатозе РЕЗ к ИНС формируется при накоплении в гепатоцитах ТГ. Поглощение клетками ГЛЮ понижается, к тому же снижается способность ИНС блокировать концентрацию АЛБ + НЭЖК в плазме крови и межклеточной среде. Усиление в гепатоцитах липогенеза (синтеза Пальм н-ЖК из ГЛЮ) и накопление в цитозоле ТГ происходит одновременно с понижением в клетках окисления ГЛЮ. Вероятно, РЕЗ к ИНС является основной причиной формирования стеатоза. Одновременно увеличивается масса висцеральной жировой клетчатки, как у мужчин, так и у женщин. Однако РЕЗ к ИНС не связана напрямую с накоплением ТГ в оментальном пуле жировой ткани. И худые пациенты с явлениями стеатоза, по данным магнитной резонансной спектроскопии, имеют РЕЗ к ИНС, высокое содержание АЛБ + НЭЖК в плазме крови и высокий уровень ТГ. Хотя РЕЗ к ИНС в большей мере связывают с висцеральным жиром, подкожная клетчатка имеет большие возможности запастись ЖК в ТГ, и ее клетки секретируют больше лептина и адипонектина. При проведении гиперинсулинового эугликемического кламп-теста (теста «зажатой скобы») депонирование ГЛЮ в форме ТГ происходит как в висцеральной, так и в подкожной жировой клетчатке. Пропорционально массе подкожной клетчатки именно она в биологической реакции эндотрофии является основным источником циркулирующих в крови АЛБ+НЭЖК. Однако НЭЖК, которые достигают гепатоцитов по нижней полой вене, мобилизованы из висцеральных адипоцитов. 60% ТГ в цитозоле поглощены гепатоцитами из межклеточной среды в форме НЭЖК.

При постпрандиальной гиперлипидемии в висцеральную жировую ткань включаются 15% ТГ, 75% остаются в подкожной клетчатке и 10% подвергаются окислению. Взаимоотношение массы клетчатки и РЕЗ к ИНС не является выраженным; у пациентов с липодистрофией при практическом отсутствии жировой ткани также развиваются РЕЗ к ИНС и явления стеатоза. Содержание адипонектина в плазме крови при стеатозе и стеатогепатите понижается, по сравнению с практиче-

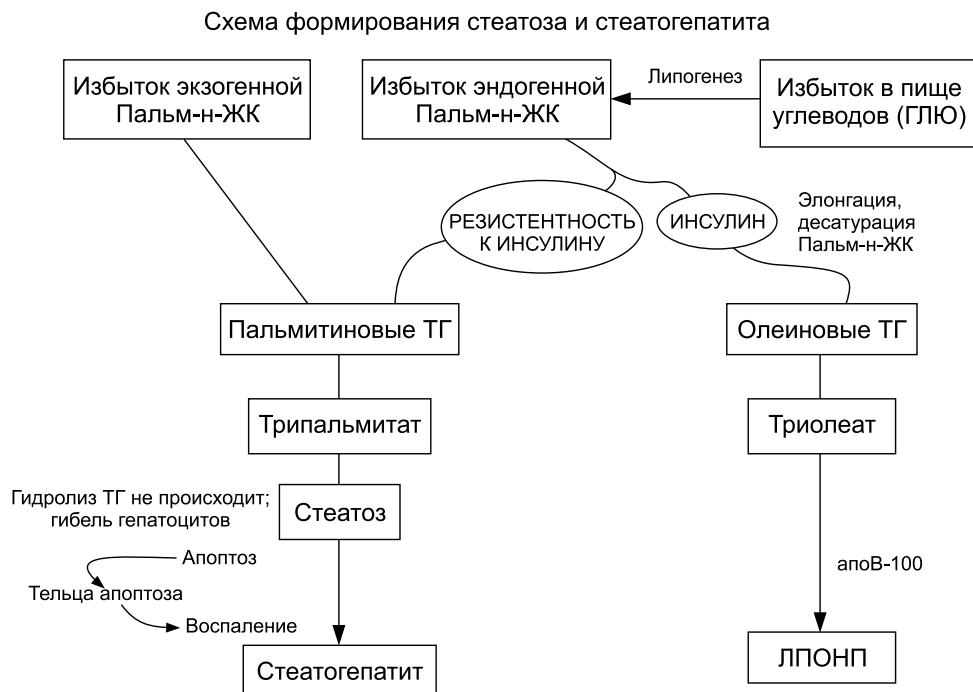


Рис. 2. Схема поступления в гепатоциты экзогенной Пальм н-ЖК, синтез ее do novo из ГЛЮ, нарушение при РЕЗ к ИНС превращения эндогенной Пальм н-ЖК в олеиновую ЖК и накопление в цитозоле афизиологичных пальмитиновых ТГ (трипальмитата) вместо физиологичных олеиновых

ски здоровыми людьми с таким же индексом массы тела; негативно соотносится адипонектин и с содержанием ТГ в печени [18]. Лечение пациентов с диабетом второго типа пиоглитазоном повышает содержание адипонектина в плазме крови, и это сочетается с уменьшением в печени содержания ТГ [14]. Подтверждение роли адипонектина получено на мышах при моделировании стеатогепатита — кормлении мышей пищей с высоким содержанием жиров и этилового спирта. Введение адипонектина вызвало регрессию стеатоза с уменьшением лимфоидной инфильтрации, повысило окисление ЖК и синтез ЖК [55].

В гепатоцитах пациентов со стеатозом при контролируемой диете (жиры обеспечивают 30% калорийности пищи) 60% ТГ в гепатоцитах сформированы из НЭЖК плазмы крови, 26% синтезированы из ГЛЮ *in situ de novo* и только 15% поступили из пищи; у здоровых добровольцев последняя цифра равна 5% [53]. Высокое содержание жиров в пище инициирует стеатоз как у экспериментальных животных, так и у человека; одновременно диета, богатая углеводами, усиливает синтез Пальм н-ЖК *de novo*. Наше понимание источников ЖК и механизмов формирования стеатоза отображено на рисунке 2.

В условиях РЕЗ к ИНС в ИНС-зависимых клетках происходит следующее:

- усилено поглощение клетками ГЛЮ через ГЛЮТ4;
- активирован синтез гликогена из ГЛЮ;
- повышена активность синтазы ЖК и синтез Пальм н-ЖК из ГЛЮ;

- активно происходит этерификация Пальм н-ЖК в пальмитиновые афизиологичные ТГ и их депонирование в ИНС-зависимых клетках;
- заблокировано окисление митохондриями ГЛЮ во всех клетках;
- снижена активность пальмитоилэлонгазы и стеатирилдесатуразы;
- ингибировано превращение Пальм н-ЖК в олеиновую моно-ЖК и
- уменьшено образование олеиновых ТГ.

Накопление ТГ в цитозоле гепатоцитов может быть следствием нарушения: а) биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии, б) токсичного действия лекарственных препаратов, в) врожденных, генетических нарушений функции митохондрий, в которых снижено образование пул ацетил-КоА из ЖК и образование АТФ в цикле Кребса. Механизмы, которые, мы полагаем, могут быть причиной стеатоза, включают:

- нарушение биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии и избыточное (более 15% всего количества ЖК) поступление с пищей экзогенной Пальм н-ЖК;
- недостаточно высокую функцию пероксисом, которые призваны оптимизировать поступающие с пищей ЖК; они только частично окисляют а) избыток экзогенной Пальм н-ЖК, афизиологичных ЖК б) нечетным числом атомов С, в) транс форм моно-ЖК и нена-ЖК, г) разветвленных ЖК и д) очень длинноцепочечных ЖК путем сочетанного α - , ω - и β -окисления;

- снижение активности β -окисления ЖК при нарушении поглощения митохондриями длинноцепочечных ЖК по причине блокады функции транспортера — карнитин-пальмитоил ацилтрансферазы;
- усиление синтеза эндогенной Пальм н-ЖК из избытка углеводов и ГЛЮ пищи и
- нарушение активности элонгации (удлинения цепи атомов С) и десатуразы (внедрение в цепь ДС) при превращении в ИНС-зависимых клетках эндогенно синтезированной С 16:0 Пальм н-ЖК в С 18:0 стеариновую и далее С 18:1 олеиновую моно-ЖК;
- превалирование в гепатоцитах пула экзогенной Пальм н-ЖК, на который филогенетически поздний ИНС действия не оказывает и не превращает в пул олеиновой моно-ЖК, а этерифицирует в пальмитиновые ТГ;
- синтез избыточного количества афизиологичных пальмитиновых ТГ вместо олеиновых, которые не могут гидролизовать стереоспецифичная гормон-зависимая липаза клеток. Фактором, который способствует стеатозу, является и абдоминальное ожирение — накопление ТГ в адипоцитах сальника и забрюшинной клетчатке. Оно ассоциировано с РЕЗ к ИНС, диабетом второго типа, нарушением толерантности к ГЛЮ, дислипидемией и метаболическим синдромом [36].

При накоплении ТГ в ИНС-зависимых гепатоцитах и при формировании в жировой ткани больших, гипертрофированных, физиологично неактивных адипоцитов они гибнут по типу апоптоза. При афизиологичной РЕЗ к ИНС, чем в большей мере заблокировано окисление ГЛЮ в митохондриях, в той же степени происходит активация синтеза из ГЛЮ Пальм н-ЖК. Однако дальнейшее превращение Пальм н-ЖК в ω -9 С 18:1 олеиновую моно-ЖК заблокировано по причине РЕЗ к ИНС. Среди всех сторон единого биологического действия ИНС при РЕЗ к ИНС нарушены только а) способность ИНС активировать окисление ГЛЮ в митохондриях и б) превращать Пальм н-ЖК в олеиновую моно-ЖК [28]. Из этого следует, что

- последней ЖК, которую синтезируют ИНС-зависимые клетки из ГЛЮ при РЕЗ к ИНС, является С 16:0 Пальм н-ЖК; ее гепатоциты этерифицируют в пальмитиновые ТГ;
- последней ЖК, которую синтезируют гепатоциты в физиологичных условиях, является С 18:1 олеиновая моно-ЖК; ее клетки этерифицируют в олеиновые ТГ.

Основное нарушение метаболизма при синдроме РЕЗ к ИНС, при неалкогольной жировой болезни печени состоит в неспособности клеток превращать Пальм н-ЖК в олеиновую моно-ЖК и включать ее в состав олеиновых ТГ. Это, вместе со способностью ГЛЮ химически гликировать белки, и составляет основу осложнений, которые развиваются при диабете [9]. Неспособность ИНС при РЕЗ к ИНС увеличивать в гепатоцитах активность пальмитоилэлонгазы и стеаторилдесатуразы при активации синтеза Пальм н-ЖК является причиной формирования пальмитиновых ТГ типа пальмитат-паль-

мита-олеат или даже трипальмитата. Напомним, что температура плавления трипальмитата составляет 48°C , и гидролизовать его в гепатоцитах при действии гормон-зависимой липазы цитозоля невозможно. По этой причине

- олеиновые ТГ типа олеат-олеат-олеат (триолеат), олеат-олеат-пальмитат гормон-зависимая липаза гепатоцитов гидролизует с высокой константой скорости реакции;
- олеиновые ТГ типа пальмитат-олеат-пальмитат липаза и пальмитиновые ТГ типа олеат-пальмитат-пальмитат гормон-зависимая липаза гидролизует с низкой константой скорости реакции [49] и
- пальмитиновые ТГ типа пальмитат-пальмитат-пальмитат в цитозоле не могут быть гидролизваны вообще.

Постепенное накопление в цитозоле гепатоцитов медленно гидролизуемых (негидролизуемых) пальмитиновых ТГ, в конечном итоге, становится причиной вначале их гипертрофии и далее гибели по типу апоптоза [39]. То же происходит и в иных ИНС-зависимых клетках; большие метаболически неактивные адипоциты перегружены пальмитиновыми ТГ, которые не гидролизует гормон-зависимая липаза. Накопление пальмитиновых ТГ происходит в скелетных миоцитах, кардиомиоцитах [25], β -клетках островков и даже клетках альвеол легких [24]. Пальмитиновые ТГ являются причиной гибели ИНС-зависимых клеток по типу апоптоза [33]. Гидролиз пальмитиновых ТГ, вероятно, частично происходит в тельцах апоптоза при иных значения рН и далее в лизосомах и пероксисомах оседлых макрофагов, которые поглощают и утилизируют тельца апоптоза в биологической реакции воспаления. Столь высокая зависимость стеатоза от ЖК пищи делает обоснованным определение состава ЖК и спектра ТГ в плазме крови, а возможно и в биоптатах печени. Это определено еще и тем, что в цитозоле клеток при РЕЗ к ИНС могут быть образованы и депонированы и стеариновые ТГ, у которых в sn-2 со спиртом глицерином этерифицирована С 18:0 стеариновая н-ЖК. Первую и третью позиции может занимать Пальм н-ЖК [15]. Какие из ТГ апоВ-100 структурирует в состав ЛПОИП, таковы параметры постпрандиальной гиперлипидемии, физико-химические свойства ТГ в цитозоле ИНС-зависимых клеток и ЛПНП в интима артерий [31].

Действие ИНС распространяется только на пул Пальм н-ЖК, который гепатоциты синтезировали эндогенно из поступивших с пищей углеводов и ГЛЮ, поглощение которых клетками активировал ИНС. В то же время, пул экзогенной Пальм н-ЖК из пищи гепатоциты также этерифицируют в пальмитиновые ТГ. Эти процессы сформировались ранее синтеза ИНС; поэтому на метаболические превращения *in vivo* экзогенной Пальм н-ЖК в олеиновую ИНС действия не оказывает. Избыточное содержание в пище Пальм н-ЖК становится причиной стеатоза и стеатогепатита и вне синдрома РЕЗ

к ИНС и без развития симптомов ожирения и диабета второго типа [54]. Формирование клетками пальмитиновых ТГ приведет к стеатозу и далее к патогенетически обоснованному стеатогепатиту. При этом присоединение вирусных инфекций, таких как гепатит или инфекционный мононуклеоз, способно активировать накопление ТГ в печени, формирование стеатоза и далее стеатогепатита. Все изложенное позволяет по-иному рассматривать действие препаратов, которые применяют при лечении стеатоза: симметричные фосфатидилхолины сои и метионин, ω -3 ЭС поли-ЖК [41], особенно Докоза, метформин, фенофибраты и глитазоны. Наши представления о патогенезе стеатоза позволяют понять возмож-

ности сочетания препаратов, а также основы профилактики столь широко распространенного в популяции человека заболевания как стеатоз и его патофизиологического превращения в стеатогепатит. Основным же в профилактике неалкогольной жировой болезни печени является диетотерапия с максимальным уменьшением содержания в пище насыщенных ЖК, особенно Пальм n-ЖК [10]. И если в патогенезе сахарного диабета задействованы две ЖК — пальмитиновая и олеиновая, то неалкогольная жировая болезнь печени — это патология ТГ, которые эти ЖК образуют в реакции этерификации со спиртом глицерином, патология пальмитиновых ТГ.

Литература

1. Баженова Е. А., Беркович О. А., Баранова Е. И. и др. Уровень лептина, распределение генотипов и встречаемость аллелей A19G полиморфизма гена лептина у пациентов с абдоминальным ожирением. Артериальная гипертензия. 2009; 4: 441–444.
2. Лисицын Д. М., Разумовский С. Д., Тишинин М. А., Титов В. Н. Кинетические параметры окисления озоном индивидуальных жирных кислот. Бюлл. эксп. биол. 2004; 134 (11): 117–119.
3. Панков Ю. А. Новый гормон адипонектин, его роль в патогенезе сахарного диабета. Вестник РАМН. 2006; 9 (10): 99–104.
4. Пицын Д. Г., Титов В. Н. Влияние однократного введения этанола на синтез липидов и липопротеинов в печени крыс. Биохимия. 1978; 43 (11): 2002–2010.
5. Свердлов Е. Д. Фундаментальные запреты биологии. Биохимия. 2009; 74 (9): 1157–1164.
6. Соколова М. А., Бабаджанова Г. Ю. Сравнительное исследование содержания лептина при сахарном диабете и у лиц с избыточной массой тела. Тер. архив. 2008; 3: 69–71.
7. Титов В. Н. Атеросклероз как патология полиеновых жирных кислот. Биологические основы патогенеза, диагностики, профилактики и лечения атеросклероза. М.: Алтус, 2002: 730.
8. Титов В. Н. Теория биологических функций и ее применение при выяснении патогенеза распространенных в популяции заболеваний. Успехи совр. биологии. 2008. 128 (5): 435–452.
9. Титов В. Н., Крылин В. В., Ширяева Ю. К. Профилактика атеросклероза. Позиционная специфичность триглицеридов, липазы крови, особые липиды молока, модификация жирных кислот растительных масел и животных жиров. Клини. лаб. диагностика. 2011; 3: 3–13.
10. Титов В. Н., Ширяева Ю. К. Артериосклероз и атеросклероз. Патология дистального и проксимального отделов артериального русла. Патогенез диабетической микроангиопатии. Клини. лаб. диагностика. 2011; 4: 3–13.
11. Шаталова Л. В., Денисенко А. Д., Таянский Д. А., Фирова Э. М. Роль адипокинов и неэтерифицированных жирных кислот в развитии инсулинорезистентности. Проблемы эндокринологии. 2009; 3: 13–17.
12. Ширяев С. В., Орлова Е. Г. Молекулярные механизмы регуляции лептином функциональной активности лимфомиелоидных клеток. Успехи совр. биологии. 2006; 5: 481–495.
13. Arita Y., Kihara S., Ouchi N. et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999; 257: 79–83.
14. Bajaj M., Suraamornkul S., Hardies L. J. et al. Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in pioglitazone-treated type II diabetic patients. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 2004; 28: 783–789.
15. Berry S. E. Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. Nutr. Res. Rev. 2009; 22: 3–17.
16. Brown M. S., Goldstein J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell. 1997; 89: 331–340.
17. Browning J. D., Horton J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and injury. J. Clin. Invest. 2004; 114: 147–152.
18. Bugianesi E., Pagotto U., Manini R. et al. Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005; 90: 3498–3504.
19. Caldwell S. H. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. J. Hepatol. 1999; 31: 430–434.
20. Coggan A. R., Kirsieva-Ware Z., Dence C. S. et al. Measurement of Myocardial Fatty Acid Esterification Using [^{1-11}C] Palmitate and PET: Comparison with Direct Measurements of Myocardial Triglyceride Synthesis. J. Nucl. Cardiol. 2009; 16: 562–570.
21. Collins J. M., Neville M. J., Hoppa M. B., Frayn K. N. De Novo Lipogenesis and Stearoyl-CoA Desaturase are coordinately regulated in the human adipocyte and protect against Palmitate-induced cell injury. J. Biol. Chem. 2010; 285: 6044–6052.
22. Emken F. A., Adlof R. O., Duval S. M. et al. Effect of triacylglycerol structure on absorption and metabolism of isotop-labeled palmitic and linoleic acids by humans. Lipids. 2004; 39: 1–9.
23. Fajas L. Regulation of peroxisome proliferators-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. Mol. Cell. Biol. 1999; 19: 5495–5503.
24. Foster D. J., Ravikumar P., Bellotto D. J. et al. Fatty diabetic lung: altered alveolar structure and surfactant protein expression. Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 2010; 298: 392–403.
25. Glenn D. J., Wang F., Nishimoto M. et al. A murine model of isolated cardiac steatosis leads to cardiomyopathy. Hypertension. 2011; 57: 216–222.
26. Green C. D., Ozguden-Akkos C. G., Wang Y. et al. Role of fatty acid elongases in determination of de novo synthesized monounsaturated fatty acid species. J. Lipid. Res. 2010; 51: 1871–1877.
27. Hagman D. K., Hays L. B., Parazzoli S. D., Poitout V. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. J. Biol. Chem. 2005; 280: 2413–2418.

28. Hodson L., Frayn K. N. Hepatic fatty acid partitioning. *Curr. Opin. Lipidol.* 2011; 22: 216–224.
29. Horton J. D. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 12027–12032.
30. Hu E., Liang P., Spiegelman B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 10697–10703.
31. Hunter J. E. Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids.* 2001; 36: 655–668.
32. Kakuma T. Leptin, troglitazone and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 8536–8541.
33. Kusminski C. M., Shetty S., Orzi L. et al. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis.* 2009; 14: 1484–1495.
34. Larsson H., Elmstahl S., Ahren B. Plasma leptin levels correlate to islet function independently of body fat in postmenopausal women. *Diabetes.* 1996; 45: 1580–1584.
35. Lee H. M., Wang G., Englander E. W. et al. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine and dietary manipulations. *Endocrinology.* 2002; 143: 185–190.
36. Lizuka K., Bruick R. K., Liang G. et al. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101: 7281–7286.
37. Leibowitz S. F. Specificity of hypothalamic peptides in the control of behavioral and physiological processes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994; 739: 12–35.
38. Lindsay R. S., Funahashi T., Hanson R. L. et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet.* 2002; 360: 57–58.
39. Machado M. V., Cortez-Pinto H. Cell death and nonalcoholic steatohepatitis: where is ballooning relevant? *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011; 5: 213–222.
40. Maeda N., Shimomura I., Kishida K. et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 2002; 8: 731–737.
41. Marsman H. A., Heger M., Kloek J. J. et al. Reversal of hepatic steatosis by omega-3 fatty acids measured non-invasively by (1) H-magnetic resonance spectroscopy in a rat model. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2011; 26: 356–363.
42. Montague C. T., Prins J., Sanders B. et al. Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for control of regional fat distribution. *Diabetes.* 1997; 46: 342–347.
43. Ntambi J. M. Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 11482–11486.
44. Promrat K. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2004; 39: 188–196.
45. Randle P. J., Garland P. D., Hales C. N. et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963; 1: 785–789.
46. Scherer P. E., Williams S., Fogliano M. et al. A novel serum protein similar to C1g, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 26746–26749.
47. Shimomura I., Shimano H., Korn B. S. et al. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 35299–35306.
48. Sierra-Honigmann M. R., Nath A. K. et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science.* 1998; 281: 1683–1686.
49. Smal D. M. The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 1991; 11: 413–434.
50. Stejskal D., Proskova J., Adamovska S. et al. Preliminary experience with resistin assessment in common population. *Biomed. Papers.* 2002; 146: 47–49.
51. Stepan C. M., Bailey S. T., Bhat S. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001; 409: 307–312.
52. Sundaesan S., Vijayagopal P., Mils N. et al. A mouse model for nonalcoholic steatohepatitis. *J. Nutr. Biochem.* 2010.
53. Utzschneider K. M., Kahn S. E. The role of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91: 4753–4761.
54. Wu X., Tong, Shankar K. et al. Lipid fatty acid profile analyses in liver and serum in rats with nonalcoholic steatohepatitis using improved gas chromatography-mass spectrometry methodology. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 747–754.
55. Xu A., Wang Y., Keshaw H. et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 91–100.
56. Yamauchi T., Kamon J., Minokoshi Y. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 2002; 8: 1288–1295.

РЕВОЛЮЦИЯ В КАРДИОЛОГИИ — ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ИЗМЕРЕНИЕ КАРДИАЛЬНЫХ ТРОПОНИНОВ: «ТРОПОНИН-ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ» БОЛЬШЕ НЕТ

В. В. ВЕЛЬКОВ

ЗАО «ДИАКОН», г. Пушкино, Московская область, Россия

Резюме. Обзор, посвященный высокочувствительному измерению концентрации кардиальных тропонинов — hs-cTn (hs — high sensitive: высокочувствительный).

Особое внимание уделяется следующим положениям.

1. Высокочувствительное измерение точно и надежно определяет концентрации тропонинов у здоровых лиц, составляющие 3–5 нг/л (нормальные значения).
2. В общей популяции слегка повышенные уровни hs-cTn выявляют лиц с высоким риском структурных заболеваний миокарда.
3. При стабильных заболеваниях коронарных артерий повышенные уровни hs-cTn связаны с риском сердечной недостаточности, но не с риском инфаркта миокарда (ИМ).
4. У пациентов с симптомами острого коронарного синдрома повышенный hs-cTn является предиктором развития ИМ, который, по сравнению со «стандартным cTn», выявляет большее количество пациентов с мио-некрозом миокардиальных клеток и прогнозирует неблагоприятные исходы.
5. С помощью серийного измерения hs-cTn диагноз ИМ можно подтвердить или исключить в течение 1–3 ч после поступления пациента.

Клинические преимущества высокочувствительного измерения кардиальных тропонинов таковы:

1. Более быстрая постановка диагноза ОИМ должна снизить неблагоприятные исходы за счет: а) раннего проведения ревазуляризации, б) раннего перевода пациента в отделение неотложной кардиальной терапии, в) раннего начала мероприятий, применяемых при ОИМ.
2. Более быстрое и надежное исключение диагноза ОИМ.
3. Сочетание результатов hs-cTn тестов с анализом клинической картины и данных ЭКГ может значительно снизить долю пациентов с клинической неопределенностью, которые в ином случае нуждались бы: а) в непрерывном мониторинге ЭКГ и б) в серийном (через 6 и 9 ч) отборе проб для определения традиционных маркеров повреждения миокардиальных клеток.
4. Экономия средств, связанная с точностью раннего установления или исключения диагноза ИМ.

Основное клиническое значение высокочувствительного измерения кардиальных тропонинов: пациенты, поступающие с сердечным приступом, которые с помощью «обычных» тропонинов диагностируются как имеющие нестабильную стенокардию, при повышенных уровнях hs-cTn будут диагностироваться как имеющие ИМ без элевации ST сегмента, что при проведении адекватного вмешательства может снизить количество неблагоприятных исходов в 1,9–2,6 раза.

Ключевые слова: ранняя диагностика, острый коронарный синдром, инфаркт миокарда, высокочувствительный тропонин.

THE REVOLUTION IN CARDIOLOGY — HIGH SENSITIVE MEASUREMENT OF THE CARDIAC TROPONINS: NO ANY “TROPONIN NEGATIVE”

V. V. VELKOV

ZAO “DIAKON”, Pushchino, Moscow region, Russia

Summary. Present review is devoted to high sensitive measurement of cardiac troponins concentration — hs-cTn (hs — high sensitive).

Special attention is attracted to following:

1. High sensitive measurement accurately determines the troponins concentration in healthy persons, ranging between 3 and 5 ng/l (normal values).
2. In population high levels of hs-cTn are revealed in persons with high risk of structural diseases of myocardium.
3. In stable diseases of coronary arteries high levels of hs-cTn are related to risk of high failure development but not risk of myocardium infarction (MI).

4. In patients with acute coronary syndrome hs-cTn elevation can be a predictor of MI development. The above mentioned test, if compared to standart cTn test reveals more patients with myocardial cells necrosis and can serve more sensitive predictor of unfavorable MI outcomes.

5. Serial measurement of hs-cTn can confirm or reject MI diagnosis in 1–3 hours after patient admission.

We can mention following benefits of high sensitive troponins measurement:

1. More quick MI diagnosis can diminish the rate of unfavorable MI outcomes due to: a) early revascularization treatment, b) early transfer of patient to cardiological intensive care unit, c) early MI treatment start.

2. More quick and more definite exclusion of MI diagnosis.

3. hs-cTn test result taken together with clinical picture and ECG signs can decrease the percentage of patients with doubtful clinical situation, who in other case need: a) constant ECG monitoring; b) serial (in 6 and 9 hrs) blood taking for traditional myocardial injury markers evaluation.

4. All this leads to financial expenses saving, because of early confirmation or rejection of MI diagnosis.

Main clinical significance of high sensitive troponins measurement is following: patients admitted with cardiac attack, in whom traditional test use leads to the diagnosis “unstable angina”, hs-cTn elevation will reveal MI without ST elevation. In this situation adequate treatment can 1,9–2,6 times decrease the rate of unfavorable outcomes.

Key words: early diagnosis, acute coronary syndrome, myocardial infarction, high sensitive troponin.

Данные для корреспонденции:

Вельков Василий Васильевич, к. б. н., директор по науке ЗАО «ДИАКОН»,
142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки, 5,
тел.: (905) 501-82-05, e-mail: vvv@diakonlab.ru

Начнем, пожалуй, с длинной цитаты. Вот что в 2011 году опубликовано в *Clinical Chemistry*, в одном из самых уважаемых и влиятельных медицинских журналов.

«Представьте себе биомаркер, который с высокой клинической чувствительностью способен диагностировать острый инфаркт миокарда (ОИМ) в течение двух часов с момента проявления ишемических симптомов. Представьте себе, что этот же биомаркер, при его серийном измерении в течение двух–трех часов, может исключить ИМ с почти 100%-м отрицательным предиктивным значением. Представьте, что этот биомаркер может обеспечивать стратификацию рисков неблагоприятных исходов у пациентов с симптоматическим и стабильным острым коронарным синдромом (ОКС), притом как в краткосрочном периоде (при поступлении), так и в долгосрочном (в течение от 6 месяцев до двух лет). И мысленно представьте себе, что этот биомаркер может также выявлять и не ишемические патологии, которые также могут быть причиной повреждений миокарда, и относить таких лиц к группе риска более высокой, чем у пациентов с ОКС.

И все это — не очковитательство, не назойливая реклама, в действительности все обстоит гораздо лучше. Представьте себе, что этот биомаркер может использоваться в “одиночку” (без его измерения в обременительных многомаркерных стратегиях) как предиктор основных неблагоприятных кардиальных событий у лиц *общей* популяции. Так что же это за биомаркер? И как он используется в клинической практике? Какие еще очевидные факты нужны для того, чтобы убедить исследователей в области лабораторной медицины и клиници-

стов бросить все и прибавить этот тест к меню их лабораторных методов?».

Первое, что приходит в голову, когда читаешь этот восторженный текст, — известная американская поговорка: *too good to be true*. Слишком хорошо, чтобы быть правдой. Так в чем же правда? Во-первых, в том, что речь идет о новых, высокочувствительных тестах на кардиальные тропонины, и, во-вторых, в том, что «тропонин-отрицательных» теперь нет. И вот почему. Высокочувствительные (hs — high sensitive) тесты определяют очень низкие концентрации тропонинов, составляющие от 1 до 20 нг/л (*на литр!*) и находящиеся ниже значений, соответствующих 99-й перцентили здоровой популяции. Точность при этом отличная — $CV \leq 10\%$. В итоге кардиальные тропонины обнаруживаются почти у 100% здоровых людей [1].

Актуальность ранней диагностики ИМ

Риск летальности, как известно, наиболее высок в первые часы после развития ИМ. Быстрота диагностирования ОИМ — критический момент, от которого зависит своевременность и обоснованность терапии. Традиционно диагностика ИМ требует длительного мониторинга (от 6 до 12 ч) уровней тропонинов и других маркеров миокардиального некроза. Задержка в постановке диагноза может привести к повышению летальности, а запоздалое исключение диагноза ИМ — к выполнению отделений неотложной терапии (ОНТ), неоправданному повышению затрат и к проблемам, с этим связанным. С другой стороны, большинство пациентов, поступающих в стационар с острой сердечной

болью, в действительности не страдают ИМ, но могут иметь высокий его риск развития [2].

Основной недостаток современных тестов для определения тропонинов — недостаток чувствительности в первые часы развития ОИМ из-за их низких циркулирующих уровней.

Эволюция тестов на тропонин

Тесты на тропонин были разработаны для того, чтобы избавиться от ложноположительных результатов, которые дает тест на креатинкиназу-МВ. Первый тест для определения циркулирующих сТnТ имел нижний предел определения (НПО) 500 нг/л, при этом для дифференциации между ИМ и нестабильной стенокардией использовались уровни в диапазоне 500–1000 нг/л.

Однако неожиданно обнаружилось, что многие (от 12 до 39%) «КК-МВ-отрицательные пациенты» одновременно являются «тропонин-положительными». Проблема была решена с помощью мета-анализа, который четко показал, что пациенты с положительными тестами на тропонины (I или T) имеют высокий риск неблагоприятных кардиальных событий *независимо* от результатов тестов КК-МВ.

Затем возник вопрос, какие пограничные уровни тропонинов должны использоваться уже не для подтверждения или исключения ОИМ, а для диагноза ОКС и стратификации рисков, с ним связанных. Масштабные проспективные исследования показали: даже небольшое повышение уровня кардиальных тропонинов у пациентов с ОКС связано с повышенным риском неблагоприятных кардиальных событий. Собственно, именно это и привело к пересмотру диагностических критериев ИМ Всемирной организацией здравоохранения еще в 1979 г. Новые критерии ИМ, наряду с другими диагностическими признаками, устанавливали, что «любая степень миокардиального некроза, вызванного ишемией, должна обозначаться как ИМ».

Но разве любые тесты на тропонин определяют любые его концентрации? Нет. И так ли уж важны низкие концентрации тропонинов? Несомненно, да. Еще в 2001 г. было обнаружено, что при ОКС даже, казалось бы, незначительное повышение уровней тропонинов, тем не менее, указывает на необходимость агрессивного клинического вмешательства, ибо эти, вроде бы, незначительные изменения связаны с риском повторного ОКС, повторной госпитализации и летальности.

Затем, при использовании сТnТ теста третьего поколения (НПО при CV < 10% — 0,3 мкг/л, 99-я перцентиль > 0,01 мкг/л), при обследовании 3557 лиц общей популяции повышенные уровни сТn наблюдались у 0,7% индивидов. Оказалось, что у таких лиц повышение тропонина $\geq 0,01$ нг/л связано как с клинической вариабельностью, так с кардиальными аномалиями, обнаруживаемыми с помощью МРТ. В целом было установлено, что такие повышенные уровни сТn *независимо* и положительно связаны: 1) с более старшим возрас-

том, 2) черной расой, 3) мужским полом, 4) с уровнями коронарного кальция (компьютерная томография), 5) с повышенными маркерами застойной сердечной недостаточности, 6) с гипертрофией левого желудочка, 6) с сахарным диабетом, 7) с хроническими болезнями почек (ХБП). Авторы сделали вывод, что «в общей популяции, у лиц без сердечной недостаточности, гипертрофии левого желудочка, ХБП или СД повышение сТnT встречается редко, что указывает на то, что верхний нормальный предел иммунологического определения тропонинов должен быть < 0,01 мкг/л. Даже минимально повышенный сТnT может говорить о субклиническом повреждении сердца и иметь важное клиническое применение...» [3].

Что такое высокочувствительный тест?

Чувствительность и специфичность коммерческих диагностических наборов предполагает, что нормальный уровень аналита не превышает 99-й перцентили (то есть 99 из 100 лиц здоровой популяции будут иметь отрицательный результат теста и только 1 из 100 может иметь ложноположительный результат). Более того, правила Национальной академии клинической биохимии США требуют, чтобы тесты на кардиальные тропонины I или T имели коэффициент вариации (CV) меньше 10%. Чем меньше значения CV, тем меньше отличия при повторных измерениях в одном и том же образце, тем выше точность и тем меньше положительных диагнозов [4].

«Обычные» тесты из-за низкой чувствительности уровень тропонинов ниже 99-й перцентили не определяют; hs (high sensitivity — высокочувствительные) тесты делают это с приемлемой точностью и чувствительностью. Успехи в изучении эпитопов тропонинов и новые способы их детекции привели к разработке методов, чувствительность которых повышена в 1000–10 000 раз, и теперь нижний предел определения (НПО) может достигать 90 пкг/л (Singulex hs-cTnI). В итоге, hs-Tn имеют два принципиальных преимущества по сравнению с «обычными» тропониновыми тестами: 1) они обнаруживают тропонины у здоровых лиц и 2) позволяют точно определить, что такое «нормальный» уровень тропонинов [99-я перцентиль, 5–8].

Нс-сТn тесты: чувствительные, высокочувствительные и ультрачувствительные

В настоящее время в отношении hs-cTn употребляются термины: 1) тест четвертого поколения, 2) чувствительный, 3) высокочувствительный, 4) ультрачувствительный. Как эти названия согласуются с конкретными реальными аналитическими характеристиками? Это становится ясным только после ознакомления с инструкцией, приложенной к соответствующему набору.

Кардиальный тропонин — это комплексный аналит, имеющий различные эпитопы. Различные антитела в со-

ставе тест-системы, по-разному взаимодействуют с различными эпитопами и в основной мере определяют аналитическую чувствительность и специфичность метода. Чувствительность тропониновых тестов по отношению к таким интерферирующим факторам, как гетерофильные антитела, ревматоидный фактор и др., может варьировать в значительном диапазоне. Всегда необходимо иметь в виду, что различные тесты на кардиальные тропонины, в том числе и высокочувствительные, реально имеют различную чувствительность. В частности, они сильно различаются по способности точно измерять низкие уровни тропонина в здоровой популяции. У одних таких тестов интервал нормальных значений (99-я перцентиль, $CV \leq 10\%$) относительно широк, у других – узок.

Существуют различия и в определении «нормального референтного уровня тропонинов» (99-я перцентиль). Согласованных критериев высокочувствительных тропониновых тестов нет, но некоторые авторы считают, что ими могут быть: 1) способность измерять концентрации тропонинов в большинстве образцов

(>80%) здоровой референтной популяции, 2) концентрации тропонинов, определяемые с $CV \leq 10\%$, должны быть значительно ниже значений 99-й перцентили для здоровой популяции [6].

Вот аналитические характеристики некоторых «обычных» и hs-cTn тестов.

Так что, в отличие от практически всех «привычных» аналитов, таких, как глюкоза, холестерин, АЛТ, АСТ и др., «нормальные» уровни тропонинов в разных тестах разные, что, мягко говоря, весьма необычно [6].

Рассмотрим, что такое «нормальные уровни тропонинов» и как они зависят от аналитических характеристик конкретных высокочувствительных тестов.

Нормальные уровни кардиальных тропонинов

Hs-cTnI ZeptX System (Singulex). Ультрочувствительный тест, основанный на детекции флуоресценции по одиночным фотонам [9]. НПО – 0,2 нг/л, $CV_{10\%}$ – 1,8 нг/л, медианное значение 99-й перцентили (у 88 здоровых лиц) – 7 нг/л. В дальнейшем, при обследовании 150 здоровых индивидов, значения 99-й перцентили

Таблица 1. Аналитические характеристики высокочувствительных тестов для определения сердечных тропонинов (по состоянию на декабрь 2010 г., данные Международной федерации клинической химии)

Тест	Нижний предел определения, мкг/л	99-я перцентиль, мкг/л	10% CV, мкг/л
Abbott AxSYM ADV	0,02	0,04	0,16
Abbott ARCHITECT	< 0,01	0,026	0,032
Abbott STAT	0,02	0,08	0,10
Beckman Coulter Access Accu	0,01	0,04	0,06
bioMerieux Vidas Ultra	0,01	0,01	0,11
Inverness Biosite Triage	0,05	<0,05	N/A
Inverness Biosite Triage (r)	0,01	0,056	N/A
Mitsubishi Chemical PATHFAST	0,008	0,029	0,014
Ortho Vitros ECI ES	0,012	0,034	0,034
Radiometer AQT80	0,0095	0,023	0,038
Response Biomedical RAMP	0,03	<0,1	0,21
Roche hscTnT	0,002	0,014	0,014
Roche Elecsys 2010	0,01	< 0,01	0,03
Roche Cardiac Reader	<0,05	<0,05	NA
Siemens Centaur Ultra	0,006	0,04	0,03
Siemens Dimension RxL	0,04	0,07	0,14
Siemens Immulite 2500 STAT	0,1	0,2	0,42
Siemens Immulite 1000 Turbo	0,15	NA	0,64
Siemens Stratus CS	0,03	0,07	0,06
Siemens VISTA	0,015	0,045	0,04
Tosoh AIAI	0,06	< 0,06	0,09

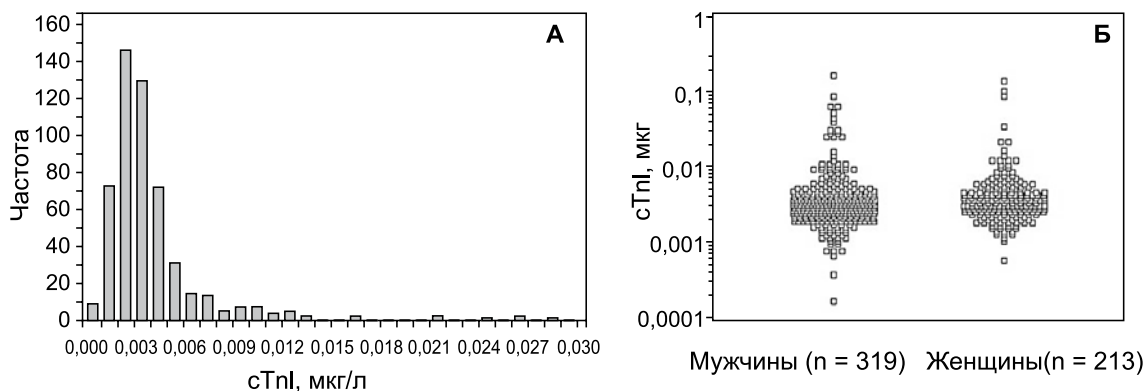
были скорректированы и составили 10 нг/л. Распределение индивидуальных значений в общей популяции — нормальное [10, 11]. Впоследствии были обнаружены вариации уровней тропонинов — как кратковременные (часы) в диапазоне от +46% до -32%, так и долговременные (8 недель) в диапазоне от +81% до -45% [12].

Прототип метода hs-cTnI, Beckman Coulter. Обследованы 542 здоровых индивида (319 мужчин, возраст $59,9 \pm 11,8$ года, и 213 женщин, возраст $59,8 \pm 13,1$ года). Нормальные уровни cTnI составили 3,3 нг/л (CV = 10%) и 1,6 нг/л (CV = 20%). В целом, cTn качественно обнаруживался у >95% здоровых лиц и мог быть количественно оценен у 80% индивидов. Медианный уровень cTnI у здоровых лиц старше 60 лет составлял 3,2 нг/л (99-я перцентиль). Распределение уровней cTnI в популяции соответствовало нормальному гауссовому, разницы между полами отмечено не было. Пограничный уровень для дискриминации между нормой и ОКС

(нестабильная стенокардия или ИМ без элевации ST-сегмента — ИМ Б ST) составлял 6,4 нг/л, чувствительность — 84%, специфичность — 89,7%. При использовании пограничного значения cTnT = 30 нг/л для диагностики ИМ чувствительность теста составляла 96,3%, специфичность — 96,3%. Авторы заключили, что «*hs-cTnI тест: 1) позволяет измерять концентрацию тропонина у здоровых лиц, 2) имеет большой потенциал для диагностики миокардиальной ишемии и 3) является предиктором неблагоприятных исходов при ОКС — см. рис. 1–3*» [13–15].

Access AccuTnI, Beckman-Coulter. В исследовании PIVUS [14] наблюдалось 1005 пожилых лиц, как ранее не имевших ССЗ, так и поступивших с ОКС. НПО — 0,006 мкг/л (6 нг/л), уровни, соответствующие 99-й перцентили, — в диапазоне 44–28 нг/л (см. рис. 3).

Итак, наличие тропонинов в кровотоке здоровых людей — факт неопровержимый, многократно проверен-



А. Распределение уровней cTnI в здоровой референтной популяции (n = 542)
Б. Уровни cTnI у мужчин и женщин в здоровой референтной популяции (n = 542)

Рис. 1. Значения концентрации cTnI в общей популяции [13]

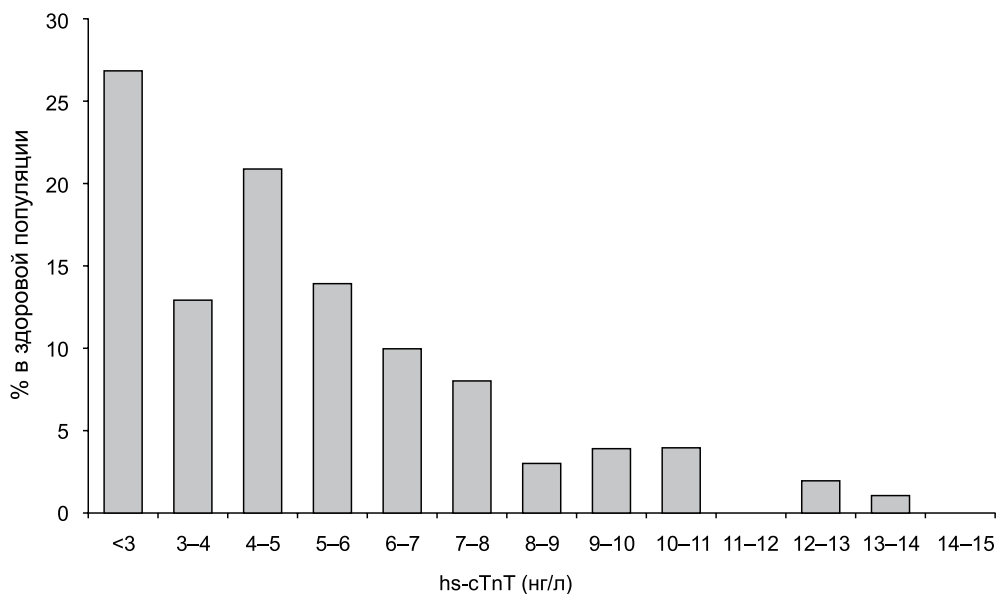


Рис. 2. Значения концентрации cTnT в общей популяции [15]

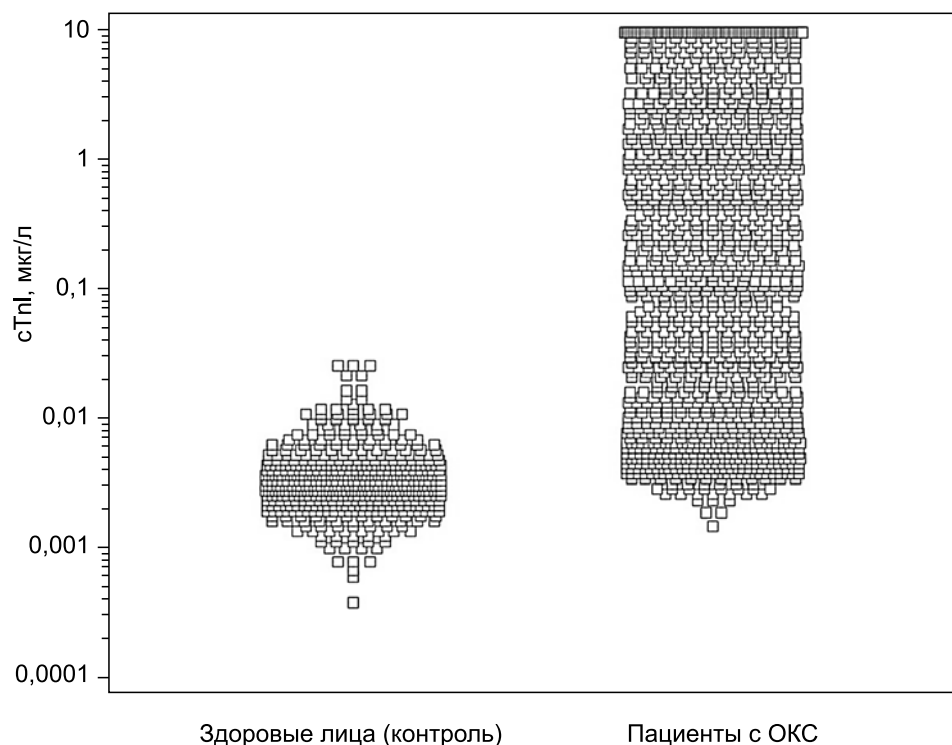


Рис. 3. Значения концентрации сТпI в общей популяции и у пациентов с ОКС разной степени тяжести [14]

ный и, как мы далее увидим, весьма (если не крайне) многозначительный. Откуда ж они там «берутся»?

Возможные механизмы «нормального» высвобождения тропонина из миокарда

1. *Маломасштабный некроз миоцитов.* Это наиболее распространенный процесс, который может вызываться ишемическим или воспалительным процессом, прямой травмой и токсическими причинами, включая сепсис [16].

2. *Апоптоз, или запрограммированная смерть клеток.* Апоптоз на фоне сохраненной целостности клеточных мембран связан с активацией каспаз, вызывающих деградацию структурных белков миокарда, что может приводить к высвобождению тропонинов в кровоток.

3. *Нормальный метаболизм миоцитов.* Указания на то, что при этом в кровоток могут выходить тропонины, были получены при изучении метаболизма C^{14} -меченных молекул ДНК в клетках миокарда. Проводилось длительное наблюдение за лицами, у которых было зафиксировано включение C^{14} в ДНК кардиомиоцитов, произошедшее в результате испытаний ядерного оружия. Обнаружено обновление кардиомиоцитов, интенсивность которого ежегодно снижалась — с 1% в год в 25-летнем возрасте до 0,45% в год в возрасте 75 лет. В целом, на протяжении жизни обновлению подверглись около 50% кардиомиоцитов. Однако пока неясно, связан ли процесс обновления миоцитов с высвобождением тропонинов в кровоток. Полагается, что разработка препаратов, стимулирующих регенерацию кардиомио-

цитов, может быть весьма перспективной для терапии некоторых патологий сердца [17].

4. *Высвобождение продуктов протеолитической деградации тропонинов из миоцитов.* Предполагается, что такой процесс может происходить без гибели миоцитов и без нарушения целостности клеточных мембран. В результате протеолиза образуются мелкие фрагменты тропонинов, которые проходят через неповрежденные клеточные мембраны. Так, к образованию продуктов деградации тропонина может вести 15-минутная «мягкая» ишемия.

5. *Повышенная проницаемость клеточных стенок.* Обратимое повреждение мембран кардиомиоцитов при напряжении миокарда или при ишемии позволяет тропонинам цитозоля выходить в кровоток. Стимулирование активности особых кардиальных белков — интегринов, связанное с напряжением миокарда, как показано *in vitro* с использованием культур клеток кардиомиоцитов, ведет к появлению в культуральной среде интактных тропонинов, и притом в отсутствие повышения лактата, что указывает на то, что выход тропонинов в кровотока может иметь место и без ишемии или некроза.

6. *Образование и высвобождение мембранных везикул.* Подобный механизм обнаружен при ишемии у клеток печени, когда большие молекулы могут выходить из внутриклеточного пространства во внеклеточное без некроза гепатоцитов, за счет образования везикул. Культивируемые *in vitro* в условиях ишемии (но без некроза) кардиомиоциты образуют везикулы, с которыми высвобождаются цитозольные ферменты.

Возможные механизмы «патологического» высвобождения тропонинов

1. *Высвобождение из ремоделированных и некальцифицированных бляшек.* Из 124 пациентов со стабильной стенокардией, которые подвергались компьютерно-томографической ангиографии (КТА), у 29 больных уровни hs-cTnT превышали 14 пг/мл. В других случаях уровни hs-cTnT составляли: 1) у лиц со здоровыми сосудами — $8,3 \pm 2,6$ пг/мл; 2) у пациентов с некальцифицированными бляшками — $12,6 \pm 5,2$ пг/мл; 3) у больных с кальцифицированными бляшками — $8,8 \pm 3,1$ пг/мл. Самые высокие уровни hs-cTnT были у пациентов с ремоделированными и некальцифицированными бляшками — $26,3 \pm 6,5$ пг/мл. По мнению авторов, это позволяет с высокой точностью идентифицировать пациентов с ремоделированными некальцифицированными бляшками. Авторы делают вывод, что «хронические и клинически молчащие трещины (разрывы) некальцифицированных бляшек с последующей микроэмболизацией могут быть потенциальным источником повышения уровня тропонина в кровотоке. Пациенты с ремоделированными и некальцифицированными бляшками имеют высокий риск развития ОКС. Hs-cTnT может быть биомаркером коронарных повреждений даже при предполагаемых стабильных заболеваниях коронарных артерий» [18].

2. *Почему тропонины выходят в кровоток при сепсисе?* Причины этого неясны, хотя показано, что в этом процессе участвуют шапероны и фактор некроза опухоли-альфа.

3. *Почему тропонины выходят в кровоток при почечной недостаточности?* Показано, что это непосредственно связано не со снижением ренальной экскреции как таковой, а, скорее, с образованием токсических соединений.

Все эти данные открыли возможность скрининга повышенных уровней hs-cTn в общей популяции. Но имеет ли такой скрининг клиническое значение?

Скрининг hs-cTn в общей популяции

Вот что дали результаты измерения уровня hs-cTnT у 3593 взрослых лиц в возрасте от 30 до 65 лет, исходно не имевших симптомов ССЗ. Наблюдение проводилось в течение 6 лет, тропонин Т определяли как стандартным тестом, так и высокочувствительным. Hs-cTnT оказался повышенным (≥ 3 нг/л) у 25% лиц, а стандартный cTnT — только у 0,7%. При этом уровень hs-cTnT превышал 3 нг/л у 37,1% мужчин, у 12,9% женщин, у 14,0% лиц моложе 40 лет и у 57,6% лиц старше 60 лет.

За время наблюдения гипертрофия левого желудочка (ЛЖ) развилась у 7,5% лиц, имевших hs-cTnT < 3 нг/л, и у 48,1% лиц с уровнем hs-cTnT ≥ 14 мкг/л. Аналогичная закономерность отмечена в отношении систолической дисфункции ЛЖ и ХБП.

В течение наблюдения зарегистрирован 151 летальный исход, в том числе 62 смерти из-за сердечно-сосуди-

стых причин. Общая смертность «в нижней квантили hs-cTnT» составляла 1,9%, а «в верхней» — 28,4%. После поправок на традиционные факторы риска, наличие ХБП, на уровни С-реактивного белка и NT-proBNP повышенный hs-cTnT оказался независимым предиктором общей смертности с отношением рисков 2,8 (1,4–5,2). Авторы заключили, что «в исследованной когорте уровни cTnT, обнаруженные с помощью высокочувствительного теста, были связаны со **структурным** заболеванием сердца и последующим риском смертности от всех причин» [19].

В другом исследовании участвовал 4221 пациент (старше 65 лет), ранее не имевший сердечной недостаточности; наблюдение проводилось в течение 11,8 лет (медианное значение). Измерение уровня hs-cTnT проводили в начале наблюдения (1989–1990 гг.) и через 2–3 года (у 2918 лиц). Повышенный уровень hs-cTnT ($\geq 3,00$ пг/мл) обнаружен у 2794 лиц (66,2%), из них сердечная недостаточность обнаружена у 1279, причем 1103 пациента скончались от сердечно-сосудистых причин. При самых высоких показателях hs-cTnT ($> 12,9$ нг/л) количество неблагоприятных событий на 100 человек в год составило: 1) по *сердечной недостаточности* — 6,4 (у лиц с недетектируемыми уровнями тропонина — 1,6; отношение рисков OR = 2,48); 2) по *кардиоваскулярной смертности* — 4,8 (у лиц с недетектируемыми уровнями тропонина — 1,1; отношение рисков — 2,91).

У лиц с исходно детектированным hs-cTnT дальнейшее повышение его уровня (отмеченное у 393 лиц, 22%) более чем на 50% оказалось связанным с повышенным риском сердечной недостаточности (OR = 1,61) и кардиоваскулярной смерти (OR = 1,65). В то же время *снижение* уровня тропонина Т на 50%, отмеченное у 247 лиц (14%), было связано с низким риском сердечной недостаточности (OR = 0,73) и кардиоваскулярной смерти (OR = 0,71). Последнее наблюдение, по мнению авторов, особенно важно, так как оно показывает, что «риск, отражаемый концентрациями hs-cTn, Т может быть модифицируемым». Авторы делают важнейший вывод: «В данной когорте пожилых лиц, не имевших сердечной недостаточности, исходные уровни cTnT и их изменения, измеренные с помощью высокочувствительного метода, значительным образом связаны с вероятностью *сердечной недостаточности и сердечно-сосудистой смерти*» [20].

Недавнее и более широкомасштабное исследование включало 9698 пациентов в возрасте от 54 до 74 лет, исходно не страдавших ССЗ и ишемическим инсультом. Изучалась связь между повышенными уровнями hs-cTnT и наличием сердечной недостаточности. Детектируемые уровни тропонина Т (≥ 3 нг/л) обнаружены у 66,5% пациентов. После статистической обработки со всеми поправками оказалось, что у лиц с самыми высокими уровнями тропонина Т (≥ 14 нг/л) по сравнению с лицами с неопределяемыми уровнями тропонина были повыше-

ны риски наличия: 1) врожденных пороков сердца, отношение рисков — 2,29; 2) сердечной недостаточности, отношение рисков — 5,95; 3) фатальных врожденных пороков сердца, OR = 7,59. Даже минимально повышенные уровни hs-cTnT (≥ 3 нг/л) связаны с повышенным риском сердечной недостаточности и смертности. Авторы делают вывод: «в общей популяции лиц, не имеющих известных врожденных пороков сердца и инсультов, уровни cTnT, детектируемые с помощью высокочувствительного определения, были связаны со случаями врожденных пороков сердца, смертностью и сердечной недостаточностью» [39].

В целом, повышенные в общей популяции уровни hs-cTnT в большей степени связаны: 1) с повышенным риском наличия структурных патологий миокарда, 2) с сердечной недостаточностью, 3) с гипертрофией ЛЖ, 4) с кардиваскулярной и общей смертностью, 5) в меньшей степени — с заболеваниями коронарных артерий и тяжелым атеросклерозом [19].

Нс-сТп при ишемии

В наблюдение были включены 120 пациентов с подозрением на ИБС, у которых проводили стресс-тестирование с параллельной перфузионной скинтиграфией миокарда. Измерение уровня hs-cTnT (НПО — 0,2 нг/л) проводили сразу после теста, через 2 и 4 ч. У пациентов перед стресс-тестом медианный уровень hs-cTnT составлял 4,4 нг/л. Через 4 ч после теста у пациентов без ишемии уровни hs-cTnT не изменились, у пациентов с «мягкой» ишемией возросли на 1,4 нг/л (на 24%), у больных с выраженной ишемией (от умеренной до тяжелой) — на 2,1 нг/л (на 40%). «Обычный» тропониновый тест этой разницы не улавливал. В целом, при рассмотрении в комплексе с клиническими факторами повышение hs-cTnT более чем на 1,3 нг/л является предиктором ишемии (отношение рисков — 3,54). Авторы считают, что «транзиторная индуцированная стрессом миокардиальная ишемия связана с повышением уровня циркулирующего тропонина, которое определяется с помощью нового ультрочувствительного метода» [21].

Отражают ли повышенные уровни hs-cTnT ишемию, не связанную с некрозом миокарда? Отличает ли серийное измерение hs-cTnT ишемию от других состояний, связанных с высвобождением тропонина? В исследовании было включено 19 пациентов, назначенных для про-

ведения диагностической катетеризации коронарных сосудов. После быстрой электростимуляции предсердий пробы крови для анализа отбирали из коронарного синуса и из периферических сосудов, измеряли уровни тропонина и лактата. Через 60 мин после электростимуляции уровень hs-cTnT в крови из коронарного синуса возрос с 6,8 пг/мл (нг/л) до 15,6 пг/мл, через 180 мин концентрация hs-cTnT в периферической крови повысилась с 5,1 до 11,6 пг/мл. При этом достоверной разницы в повышении hs-cTnT между пациентами с ИБС и заболеваниями коронарных артерий и лицами без указанной патологии выявлено не было. Авторы полагают, что «короткий период ишемии, не связанный с явным инфарктом, вызывает высвобождение небольшого количества cTnT, небольшое повышение hs-cTnT также характерно для повышенной работы миокарда даже у тех пациентов, для которых нет объективных данных, свидетельствующих о миокардиальной ишемии или об обструктивном заболевании коронарных артерий» [22].

Нс-сТп при марафонском беге

После того, как греческий воин Филиппид, пробежав от Марафона до Афин 42 км 195 м, крикнул: «Радуйтесь, афиняне, мы победили!», он упал замертво. Можно не сомневаться, его кардиальные тропонины в тот момент были весьма высокими...

В наблюдение были включены 85 марафонцев со средним возрастом 45 лет, 44% которых участвовали в 1–10 забегах, 36% — более чем в десяти; среднее время пробега дистанции составляло 3,76 ч. Контрольная группа включала 546 здоровых лиц. Измеряли: 1) уровень cTnT (тесты 4-го поколения, НПО — 10 нг/л, 99-я перцентиль — 35 нг/л), 2) cTnI (НПО — 9 нг/л, 99-я перцентиль — 28 нг/л), 3) hs-cTnT (НПО — 2 нг/л, 99-я перцентиль — 14 нг/л). После забега уровень тропонинов возрос в 8–10 раз, через 24 ч снизился, но превышал исходные значения в 3–4 раза [23], см. таблицу 2.

При обследовании 78 атлетов — участников марафона «Берлин 2006» уровень тропонинов измеряли перед стартом, после финиша и спустя 2 недели после забега. Перед стартом «обычный» cTnT не обнаруживался, hs-cTnT (> 13 нг/л) был обнаружен у 28% лиц. Сразу после финиша cTnT был обнаружен у 43% лиц, hs-cTnT — у 100% бегунов. Через 2 недели картина соответствовала предстартовой [24].

Таблица 2. Уровни кардиальных тропонинов (нг/л) при марафонском беге [23]

Исследование	cTnT	cTnI	hs-cTnT
	НПО — 10,0 нг/л 99-я % — 35,0 нг/л	НПО — 9,0 нг/л 99-я % — 28,0 нг/л	НПО — 2,0 нг/л 99-я % — 14,0 нг/л
На старте	NA	7,0 (100%)	4,0 (100%)
Финиш	26,0	57,0 (814%)	42,0 (1050%)
Через 24 ч	NA	31,0 (443%)	12,0 (300%)

Чем же вызвано повышение уровней тропонинов у марафонцев? Некрозом кардиомиоцитов? Ишемией? Недостатком энергии, поступающей в сердце? Индукцией воспалительного ответа? Ренальной дисфункцией?

При исследовании 102 марафонцев со средним возрастом 42 ± 9 года комплекс биомаркеров определяли перед стартом, сразу после финиша, через 24 ч и 72 ч после забега. Измеряли, в частности, маркеры: 1) кардиальные — hs-cTnT, NT-proBNP, h-FABP (кардиальный белок, связывающий свободные жирные кислоты), 2) воспалительные — hs-CRP, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО-альфа, 3) ренальные — цистатин С. Выяснилось, что уровень hs-cTnT достигал пика после финиша (31,07 нг/л, повышение в 10 раз) и возвращался к норме (3,61 нг/л) через 72 ч. После статистической обработки неожиданно обнаружилось, что степень повышения уровня hs-cTnT у конкретных атлетов не была связана ни с интенсивностью тренировок, ни со временем, показанным на финише (это важно для спортивной медицины). Сходные тенденции показали NT-proBNP (92,6 и 34,9 нг/л) и h-FABP (44,99 и 7,66 мкг/л). Провоспалительные и почечные маркеры после финиша также сильно изменялись, по сравнению со стартовыми уровнями их повышение составляло: ИЛ-6 — в 15,5 раза, hs-CRP — в 28 раз, цистатин С — в 1,22 раза; при этом все эти сдвиги не были связаны с повышением hs-cTnT. Авторы утверждают, что «кардиальные маркеры возрастают сразу после марафонского забега. При этом интересно, что их уровни возвращаются к нормальным через 72 ч. Такая кинетика с характерным острым пиком свидетельствует о том, что развитие кардиального некроза при марафонском забеге весьма маловероятно, и что, скорее всего, такая кинетика вызвана нарушением метаболизма миоцитов» [25].

Нс-сТп при стабильных заболеваниях миокарда

Еще до появления теста hs-cTn было отмечено, что концентрации тропонинов даже ниже «традиционных» пограничных уровней, тем не менее, указывают на повышенный риск грядущих коронарных событий и вполне могут применяться для стратификации соответствующих рисков. А пациентам с ОКС и слегка повышенными «обычными» тропонинами и, соответственно, повышенным риском неблагоприятного исхода болезни, часто показано раннее инвазивное вмешательство. При этом hs-cTn обычно повышен при стабильных заболеваниях коронарных артерий, сердечной недостаточности, кардиальном амилоидозе, а также у пожилых пациентов [20]. Каковы же возможности использования hs cTnT в диагностике ССЗ?

В исследовании участвовало 57 пациентов со стенозом аорты и гипертрофией миокарда. У всех пациентов уровни hs-cTnT были выше НПО и коррелировали с эхокардиографическими индексами, наиболее сильно — с массой ЛЖ. Авторы считают, что «hs-cTnT может давать прогностическую информацию, касающуюся паци-

ентов со стенозом аорты. Масса ЛЖ — важная детерминанта уровня hs-cTnT у стабильных пациентов» [26].

В другом исследовании участвовали 103 стабильных пациента с дисфункцией ЛЖ, в том числе 56 пациентов с легочной прекапиллярной гипертензией (ЛПГ), которым была назначена катетеризация правого сердца. У 46,7% пациентов с дисфункцией ЛЖ и 37,5% с ЛПГ наблюдались повышенные (> 99-й перцентили) уровни hs cTnT, в свою очередь, связанные с риском летальности (отношение рисков — 3,0). Авторы считают, что «у пациентов с дисфункцией ЛЖ и ЛПГ hs-cTnT связан с нарушением миокардиальной функции и является независимым прогностическим предиктором смертности» [27].

В другом исследовании оказалось, что у 97,7% из 3679 обследованных пациентов (наблюдение продолжалось в среднем 5,2 года) со стабильными заболеваниями коронарных артерий (ЗКА), без жалоб на боли в сердце и с нормальной функцией ЛЖ, обнаруживается hs-cTnT (предел определения — 10 нг/л), у 407 пациентов (11,1%) его концентрация превышала пограничный уровень (99-я перцентиль, 13,3 нг/л). За период наблюдения обнаружено, что исходно повышенные уровни hs-cTnT сильно и линейно связаны с риском развития сердечной недостаточности, кардиоваскулярной летальности, но, как неожиданно оказалось, не с риском ИМ. Авторы считают, что «после поправок на другие независимые прогностические индикаторы у пациентов со стабильными заболеваниями коронарных артерий концентрации кардиального тропонина Т, измеренные с помощью высокочувствительного метода, имеют значительную связь с риском кардиоваскулярной смерти и сердечной недостаточности, но не с риском инфаркта миокарда» [28].

В еще одном исследовании 1057 пациентов со стенокардией (808 — со стабильной, 249 — с нестабильной) перенесли реваскуляризацию миокарда; наблюдение продолжалось 4 года. У всех пациентов «обычные» тропонины не обнаруживались. Медианное значение hs-cTnT во всей когорте составляло 8 (5–14) нг/л. Уровни hs cTnT по терцилям составили (мкг/л): в первой — 5 (4,4–5,5), во второй — 8 (7–10), в третьей — 17 (14–20) и оказались положительно связаны: 1) с пожилым возрастом, 2) с мужским полом, 3) с повышенными значениями ИМТ, 4) с наличием сахарного диабета, 5) с нестабильной стенокардией, 6) со снижением фракции выбора ЛЖ, 7) с повышенным уровнем NT-proBNP, 8) со снижением скорости клубочковой фильтрации, 9) с повышенным уровнем hs-CRP. За период наблюдений произошло 83 летальных исхода. Статистический анализ показал, что hs-cTnT является независимым предиктором летальности в течение 4 лет, при этом возрастание его уровня в 2,14 раза повышало отношение рисков на 1,47. Авторы полагают, что «у пациентов со стабильной и нестабильной стенокардией и с недетектируемыми уровнями «обычного тропонина» повышенный hs-cTnT связан со снижением выживаемости» [29].

Связана ли множественность атеросклеротических бляшек с уровнями hs-cTnT? В одном из исследований 615 пациентов без ОКС были обследованы с помощью КТА и разделены на группы согласно тяжести заболевания коронарных артерий, исходя из множественности поврежденных сосудов: 1) без ЗКА, или мягкое ЗКА (<50% поврежденных сосудов), 2) умеренное ЗКА (повреждено 50–70% сосудов), 3) тяжелое ЗКА (>70% поврежденных коронарных сосудов), 4) множественное ЗКА (повреждение многих сосудов). Медианные уровни hs-cTnT (нг/л) составляли: у лиц без ЗКА — 3,7; у пациентов с мягкими ЗКА — 4,5; у пациентов с умеренными ЗКА — 5,5; у пациентов с тяжелыми ЗКА — 5,7; у пациентов с множественным ЗКА — 8,8. Для hs-CRP и NT-proBNP такой закономерности не обнаруживалось. Среди пациентов без ЗКА только 11% имели уровень hs-cTnT в верхней квантили, а среди пациентов с множественным ЗКА — 62%. Статистический анализ показал, что hs-cTnT является независимым фактором риска наличия ЗКА. Авторы сделали вывод: «у пациентов без ОКС даже мягкая степень заболевания коронарных артерий связана с количественно определяемыми уровнями hs-cTnT» [30].

hs-cTn и стабильная хроническая сердечная недостаточность

В одно из исследований были включены 4053 пациента с хронической сердечной недостаточностью, у которых измеряли уровни cTnT (НПО ≤ 10 нг/л) и hs-cTnT (НПО ≤ 1 нг/л). У лиц с повышенными уровнями cTnT или hs-cTnT (выше медианного значения 12 нг/л) сердечная недостаточность была тяжелее, чаще наблюдались неблагоприятные исходы. Повышенный уровень hs-cTnT был связан с риском летальности (780 случаев, отношение рисков — 2,08), причем и у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, у которых уровни «обычного» cTnT были нормальными [31].

Что показывает уровень hs-cTnT при неишемической кардиомиопатической дилатации (КМД)? В течение 4 лет наблюдалось 85 пациентов с застойной сердечной недостаточностью, за это время было 20 летальных случаев (кардиальная смерть). Измерялись тропонины, VNP и фракция выбора ЛЖ. Оказалось, что уровень «обычного» cTnT был повышен (≥ 30 нг/л) у 4 пациентов (5%), hs-cTnT (≥ 10 нг/л) — у 46 (54%) пациентов. Среди не выживших cTnT был повышен у 2 пациентов (2%), hs-cTnT — у 17 (85%). Авторы полагают, что «у пациентов с застойной сердечной недостаточностью высокая сывороточная концентрация hs-cTnT — это полезный прогностический предиктор, не зависящий ни от сниженной фракции выбора ЛЖ, ни от уровней VNP, что свидетельствует о том, что повышенные концентрации hs-cTnT чувствительным образом отражают развивающееся повреждение миокарда» [32].

hs-cTn при нестабильной стенокардии

По крайней мере 30% пациентов, поступающих в лечебные учреждения с ОКС без элевации сегмента ST, согласно «обычным» тестам на тропонин, миокардиального некроза не имеют. В одном из исследований у 50 пациентов с нестабильной стенокардией и у 50 больных с ИМ Б ST при поступлении в больницу, через 2 и через 8 ч измеряли уровни тропонина с помощью теста папо-cTnI Nanosphere (НПО — 0,2 нг/л). У большинства лиц с нестабильной стенокардией результаты папо-cTnI теста были положительными (≥ 3 нг/л, CV < 10%) при поступлении — у 44%, через 2 ч — у 62% и через 8 ч — у 82%. У больных с установленным повреждением миокарда при отрицательном результате теста на «обычный» cTnT (порог 100 нг/л) в первые 2 ч, тест папо-cTnI при поступлении был положительным (≥ 3 нг/л) у 78% лиц, через 2 ч — у 98% лиц. Авторы заключают: «у значительной части пациентов, которые в настоящее время классифицируются как имеющие нестабильную стенокардию, папо-cTnI тест выявляет миокардиальные повреждения, что свидетельствует о том, что ишемия с сердечной болью, но без повреждения миокарда, является редким событием» [33].

hs-cTn при ОКС и ИМ

Считается, что главное преимущество теста hs-cTn — раннее, в первые часы после начала сердечного приступа, выявление ИМ. Именно благодаря этому высокочувствительные тропонины будут «спасать жизни» [1, 6–8]. Можно ли доверять таким утверждениям? Приведем данные ряда исследований.

Все 103 пациента, поступившие в больницу с кардиальным болевым синдромом, были «отрицательными» по «обычному» тропонину (99-я перцентиль — 100 нг/л), однако по hs-cTnI (99-я перцентиль — 40 нг/л) «положительными» оказались 64,1% пациентов. Через 6 ч количество «положительных» по обычному тропонину составило 16%, по hs-cTnI — 62%; через 12 ч — 56% и 82%, через 24 ч — 80% и 97% соответственно (рис. 4). Авторы делают вывод, что «hs-cTnI имеет лучшую диагностическую точность и потенциал выявлять повреждения миокарда раньше, чем текущие cTnI тесты» [34].

У 371 пациента с подозрением на ОКС уровень hs-cTnI (99-я перцентиль — 40 нг/л) измеряли при поступлении, через 6 и 24 ч. Наблюдение продолжалось 60 дней. Диагноз ИМ был окончательно установлен у 49 больных (13%). Чувствительность и специфичность теста hs-cTnI составили при поступлении 74% и 84%, впоследствии — 94% и 81% соответственно. За время наблюдения у 59 пациентов были зафиксированы 2 кардиальных смерти, одна некардиальная смерть, 49 случаев ИМ; были проведены 7 операций аорто-коронарного шунтирования (АКШ) и 36 операций чрезкожной коронарной ангиопластики. У больных с уровнем hs-cTnI < 6 нг/л количество указанных событий составило 2,8%;

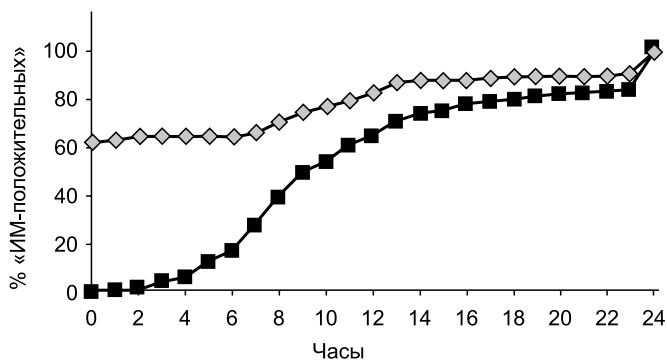


Рис. 4. Динамика количества «тропонин-положительных» результатов при ОКС. Случаи с уровнем hs-cTnI > 40 нг/л — ромбы, с уровнем cTnI > 100 нг/мл — квадраты [34]

от 6 до 40 нг/л — 11,1%; от 40 до 100 нг/л — 24,1%; более 100 нг/л — 55,1%. Авторы заключают: «hs-cTnI — это чувствительный ранний биомаркер ИМ и независимый предиктор неблагоприятных исходов у любых пациентов с симптомами ОКС и положительными результатами теста hs-cTnI» [35].

290 пациентов с симптомами кардиальной ишемии, 120 лиц составили контрольную группу. Проведен тест на hs-cTnI (НПО — 2,06 нг/л, CV_{20%} — 2,95 нг/л, CV_{10%} — 8,66 нг/л). Измерение hs-cTnI при поступлении дало 81% «ИМ положительных» диагнозов, определение «обычного» cTnI — лишь 62% [36].

1503 пациента, поступивших с нестабильной стенокардией и non-STEMI; контрольная группа включала 542 индивида. Проведен тест на hs-cTnT (НПО при CV_{10%} — 3,3 нг/л, при CV_{20%} — 1,6 нг/л). Тест был положительным у 95% здоровых лиц в возрасте менее 60 лет; медианный уровень концентрации составлял 3,2 нг/л (1,1–7,9) при 99-й перцентили 11 нг/л. Пограничный уровень для дискриминации между здоровыми индивидами и пациентами с ИМ Б ST сегмента составил 6,4 нг/л, чувствительность теста — 84,8%, специфичность — 89,7% [13].

718 пациентов с подозрением на ОИМ, уровень hs-cTn определяли с помощью тестов Abbott Architect Troponin I, Roche High-Sensitive Troponin T, Roche Troponin I, Siemens Troponin I Ultra и стандартного теста Roche Troponin T. Окончательный диагноз ОИМ был установлен у 123 (17%) пациентов. Значения AUC ROC для hs-cTn тестов составляли: Abbott-Architect Troponin I, Roche High-Sensitive Troponin T, Siemens Troponin I Ultra — 0,96; Roche Troponin I — 0,95 против 0,90 для стандартного теста Roche Troponin T. Среди пациентов, которые поступили в течение трех часов после начала болевого приступа, значения AUC ROC для hs-cTn тестов составляли ≥ 0,93 против 0,76 для стандартного тропонинового теста. Авторы полагают, что «диагностическая точность высокочувствительных тестов на тропонин является отличной и эти тесты могут существенно улучшить раннюю диагностику ОИМ, в особенности у пациентов со свежим болевым синдромом» [37].

377 пациентов (средний возраст 54 года) с сердечной болью и подозрением на ОКС. При поступлении в крови измеряли уровень hs-cTnT (99-я перцентиль — 13 нг/л), через 4 ч проводили КТА. В итоге, диагноз ОКС был выставлен у 37 (9,8%) пациентов. Специфичность и чувствительность теста hs-cTnT для ранней диагностики ОКС составили 62 и 89% соответственно, положительная предсказательная ценность — 38%, отрицательная — 96%. По сравнению с «обычным» тестом cTnT, тест hs-cTnT выявлял на 27% больше пациентов с ОКС. В целом, уровень hs-cTnT выше 99-й перцентили был сильным предиктором ОКС (OR = 9,0). Данные КТА показали, что повышенный уровень hs-cTnT связан со многими факторами (наличие и тяжесть ЗКА, масса ЛЖ, фракция выброса ЛЖ, дисфункция ЛЖ). Авторы полагают, что «среди пациентов с сердечной болью, имеющих риск ОКС от низкого до умеренного, hs-cTnT показывает хорошую чувствительность и специфичность по отношению к ОКС. Повышение hs-cTnT выявляет пациентов с повреждениями миокарда и со значительными структурными заболеваниями сердца, притом безотносительно к диагнозу ОКС» [38].

137 пациентов (возраст 66 ± 16 лет), поступивших в больницу с острой сердечной болью, окончательный диагноз ОИМ выставлялся с учетом значений как «обычного» cTnT (99-я перцентиль — 40 нг/л), так и hs-cTnT (99-я перцентиль — 14 нг/л). Оказалось, что hs-cTnT «диагностировал» ОИМ (был выше 99-й перцентили) у 30 пациентов, а обычный cTnT — у 20. Уровни hs-cTnT ниже НПО (3 нг/л) имели 100% отрицательную предсказательную ценность для исключения ОИМ. Количество сердечно-сосудистых событий в течение 6 месяцев у пациентов с hs-cTnT < 14 нг/л было низким, а у пациентов с cTnT ≥ 40 нг/л — высоким. Самым высоким риск неблагоприятных событий был у пациентов с положительной динамикой уровня hs-cTnT > 30%. Авторы делают вывод: «высокочувствительное измерение имеет отличные диагностические характеристики для пациентов с началом развития сердечной боли. Даже малое повышение hs-cTnT указывает на риск смерти от ОИМ» [39].

4513 пациентов, поступивших в больницу с ОКС без элевации ST, измеряли уровень cTnI-Ultra (99-я перцентиль — 40 нг/л). 2924 пациента с исходным уровнем cTnI ≥ 40 нг/л имели высокий риск летальности или ОИМ в течение 30 дней (6,1%), а пациенты с уровнем cTnI < 40 нг/л — меньший (2,0%). В целом уровни Ultra-cTnI ≥ 40 нг/л были связаны с *трехкратным* повышением риска летальности или ОИМ в течение 30 дней. Более того, пациенты с небольшим повышением cTn (от 40 до 100 нг/л) имели значительно повышенный риск смерти или ИМ в течение 30 дней (5% против 2,4%) и смерти в течение 12 месяцев — 6,4% против 2,4% [40].

1452 пациента, поступивших с ОКС, измеряли как hs-cTnT, так и «обычный» Tn, и оценивали риск смерти в течение 1 года. Показано, что 60% пациентов имели

уровни обоих тестов выше пограничных значений; у них риск общей летальности составил 10,7% (от ОИМ — 8,7%). 16% больных имели повышенный hs-cTnT и нормальный «обычный» cTnT; их риск общей смертности составлял 9,2% (от ОИМ — 5,2%). В то же время 24% пациентов с низкими уровнями обоих тропонинов имели риск смерти от всех причин 2,6%, от ОИМ — 2,4%. Авторы полагают, что *«измерение hs-cTnT по сравнению со старым тестом на cTnT выявляет большее количество пациентов с повреждением миокарда, имеющих повышенный риск новых кардиальных событий»* [41].

233 пациента с сердечной болью, без повышения ST-сегмента. При поступлении и через 2 ч производили измерение уровня hs-cTnT (Roche, пограничный уровень ≥ 14 нг/л) и обычных тропонинов (Roche Troponin T, 4-е поколение, пограничный уровень ≥ 40 нг/л, и Beckman Coulter Accu-TnI, пограничный уровень ≥ 60 нг/л). По отношению к диагнозу ОИМ эффективность тестов оказалась следующей: 1) hs-cTnT — при поступлении чувствительность 98%, специфичность — 82%, через 2 ч — 100% и 79% соответственно; 2) cTnT — при поступлении чувствительность 70%, специфичность — 91%, через 2 ч — 77% и 89% соответственно; 3) cTnI — при поступлении чувствительность 80%, специфичность — 92%, через 2 ч — 86% и 91% соответственно. Авторы считают, что *«по сравнению с обычными тропониновыми тестами использование hs-cTnT улучшает точность ранней диагностики ОИМ. С помощью измерения hs-cTnT ОИМ можно исключить уже в первые часы после поступления»* [42].

В течение 2 лет наблюдались 332 пациента с подозрением на ОКС. Тропонины измеряли с помощью тестов Roche Elecsys hs-TnT, Abbott Architect cTnI-3 и Roche Elecsys TnT. Регистрировали основные неблагоприятные кардиоваскулярные исходы (смерть, нефатальные ИМ) и реваскуляризацию. *В течение 30 дней* после поступления неблагоприятные исходы имели место у 14 пациентов, причем тест hs-cTnT выявил 11 таких больных (78,6%), cTnI-3 и cTnT — по 10 больных (71,4%). *В течение двух лет* неблагоприятные исходы имели место у 68 (20,5%) больных, причем исходный тест hs-cTnT выявил 43 таких больных (63,2%), cTnI-3 — 34 (50,0%), cTnT — 29 (42,6%). Авторы считают, что у пациентов, поступивших с подозрением на ОКС, *«hs-cTnT превосходит cTnT по своей способности предсказывать неблагоприятные кардиоваскулярные исходы в течение двух лет. Лица с уровнями hs-cTnT ниже предела определения относятся к группе пациентов с очень низким уровнем неблагоприятных исходов»* [43].

2506 пациентов, поступивших с подозрением на ОКС, наблюдались в течение 6 мес. При поступлении в больницу проводилось однократное измерение hs-cTnT и cTnT. Особенно высокую диагностическую и прогностическую эффективность hs-cTnT показал у тропонинотрицательных» пациентов. Авторы полагают, что *«измерение hs-cTnT дает лучшую диагностическую и прогно-*

стическую информацию, и поэтому должно быть внедрено в рутинную клиническую практику в качестве стандартного теста» [44].

447 пациентов, поступивших с ОКС Б ST, наблюдались 4 года. Учет результатов теста hs-cTnT привел к повышению количества пациентов с диагнозом ИМ Б ST на 33% — с 201 до 268, причем эти 67 пациентов с измененным на ИМ Б ST диагнозом имели такую же смертность в течение 4 лет (25,1%), как и пациенты с исходно диагностированным ИМ Б ST (23,6%). Авторы считают, что *«применение теста hs-cTnT вместо cTnT повышает долю пациентов с ИМ Б ST среди пациентов с ОКС Б ST и значительно улучшает стратификацию риска смертности в течение 4 лет»* [45].

Многоцентровое исследование включало 1098 пациентов (37% из них было старше 70 лет); диагноз ОИМ был установлен у 24% пациентов. Среди пожилых пациентов без ОИМ уровни hs-cTnT были повышены у 51%, уровни TnI-Ultra Siemens — у 17%, cTnI Abbott Architect — у 13%. Пограничные уровни для диагностики ОИМ у пожилых пациентов составили: для Roche hs-TnT — 54 нг/л (99-я перцентиль — 14 нг/л), для TnI-Ultra Siemens — 45 нг/л (99-я перцентиль — 40 нг/л), для cTnI Abbott Architect — 32 нг/л (99-я перцентиль — 28 нг/л). Авторы заключают: *«Высокочувствительные измерения тропонинов имеют высокую диагностическую точность для пожилых лиц. Мягкое повышение тропонинов является обычным для пожилых пациентов, не имеющих ОИМ, поэтому оптимальные пограничные уровни высокочувствительных тропонинов для пожилых пациентов должны быть существенно выше, чем для более молодых»* [46].

hs-cTn и диагностика ОИМ: серийные измерения

Применение hs-cTn для диагностики пациентов с подозрением на ОИМ привело к повышению количества как положительных, так и ложноположительных результатов. Для решения этой проблемы предлагается: 1) использование точно определенных значений уровней hs-cTn, соответствующих 99-й перцентили, 2) учет значений биологической вариабельности hs-cTn, 3) серийные измерения hs-cTn и 4) вычисление значений дельты (разницы концентраций между соседними точками). Следует учитывать, что на значения дельты могут оказывать интерферирующее влияние биологическая вариабельность и значения коэффициента вариации. Еще одна сложность: кинетика выхода тропонина в кровь при разных типах ИМ Б ST непредсказуема и может сильно варьировать. Рекомендуется, чтобы значения дельты при определении динамики тропонинов составляли 15–20% [47–48].

Даже в том случае, когда уровни hs-cTn находятся в нормальном диапазоне, повышение дельты может быть ранним указанием на развитие ОКС. Таким образом, преимущества hs-cTn не только в его высокой чувствительности в районе 99-й перцентили, но и в том, что он

может отслеживать при развитии ИМ раннюю динамику малых концентраций тропонинов [49, 50]. И что крайне важно, отслеживать скорость повышения уровней тропонинов при развитии ОКС еще до того момента, когда они превысят 99-ю перцентиль. В этом случае hs-cTn оценивает: 1) направление развития ОКС, 2) скорость этого развития и 3) вероятные последствия нестабильной стенокардии [51].

В большинстве ранних исследований диагностической ценности hs-cTn дельту измеряли в течение 6 ч после поступления больного и сопоставляли с развитием не только ОИМ, но с развитием аритмии и острой декомпенсированной сердечной недостаточности [52–54]. Вот результаты самых показательных исследований.

545 пациентов с подозрением на ОКС. Наблюдение — 60 дней. Серийные измерения в течение 4–12 ч. hs-cTnI, пограничный уровень для диагноза ОИМ > 0,01 мкг/л, 99-я перцентиль. Чувствительность и специфичность составляли для исходного уровня hs-cTnI — 88% и 79,9% соответственно, для последующих измерений — 100% и 79,4% соответственно, для дальнейших измерений — 100% и 89,4% соответственно. Летальность в группе пациентов с повышенным hs-cTnI составляла 74%, в группе с нормальным — 26%, отношение рисков — 8,9. Авторы считают, что *«hs-cTnI — это чувствительный метод раннего выявления ИМ, предсказывающий риск неблагоприятных исходов у пациентов с симптомами ОКС»* [55].

Многоцентровое исследование. 1818 пациентов с подозрением на ИМ. Измерение проводилось через 3 и 6 ч после поступления. Значения AUC ROC составляли: для hs-cTnI (пограничный уровень — 0,04 нг/мл) — 0,906, для cTnI — 0,85. Чувствительность и специфичность hs-cTnI составляли 90,7% и 90,2% соответственно. Для пациентов, поступивших в течение 3 ч, однократное измерение hs-cTnI имело отрицательное предиктивное значение — 84,1% и положительное — 86,7%. Уровни hs-cTnI > 0,04 нг/мл были независимо связаны с риском 30-дневной летальности (отношение рисков — 1,96). Авторы считают, что *«использование hs-cTnI улучшает раннюю диагностику ОИМ и стратификацию рисков, с ним связанных, и притом независимо от времени начала левого синдрома»* [52].

Пациенты, поступившие с ОКС. hs-cTnT (99-я перцентиль — 13,5 нг/л) выявил 45 пациентов с ИМ Б ST, обычный cTnT — только 20. После серийных измерений hs-cTnT выявил еще 9 пациентов с ИМ Б ST. Время диагноза для hs-cTnT составляло 108,7 мин против 246,9 мин для cTnT (медианные значения) [56].

62 пациента, поступивших с нестабильной стенокардией и ИМ Б ST, «обычный» тропонин ($\geq 0,03$ мкг/л) — отрицательный. Серийные измерения hs-cTnT в течение 3–6 ч, развивающийся ИМ Б ST диагностирован у 26 пациентов, у 36 пациентов установлена нестабильная стенокардия. В течение 6 ч количество ИМ

плавно возрастало от 61,5% при поступлении до 100% к 6-му часу. Общее количество случаев ИМ Б ST возросло на 34,6%. Значения дельты (повышения hs-cTnT) составляли >117% за 3 ч и $\geq 243\%$ за 6 ч и имели специфичность 100% при чувствительности 69–76%. «Обычный» тропонин таких пациентов не выявлял. Авторы полагают, что *«hs-cTnT выявляет большее количество случаев ИМ Б ST и обеспечивает раннюю диагностику развивающегося ИМ Б ST. Удвоение концентрации hs-cTnT в течение 3 ч связано с положительным предиктивным значением, составляющим 100%, и отрицательным, составляющим 88%»* [53].

Полагается, что серийные измерения hs-cTn при поступлении и затем в течение 1–3 ч позволяют быстро принять верное клиническое решение. В стандартных условиях, при измерении «обычного» тропонина клиническое решение принимается, как правило, через 6–9 часов. Считается, что серийные измерения hs-cTn позволяют: 1) улучшить исходы у пациентов с ОКС и 2) дать значительный экономический эффект, связанный с исключением ОИМ у пациентов, поступивших с ОКС [47].

В целом, измерение дельты с одной стороны повышает специфичность, но с другой — снижает чувствительность, что приводит к более позднему выявлению развивающегося ОИМ. Как найти тонкий баланс между чувствительностью и специфичностью, чтобы не переполнить отделение неотложной кардиальной терапии теми, кому она не нужна, и не выписать из больницы тех, с кем через несколько дней может случиться непоправимое? Какие именно значения подъема или снижения hs-cTn имеют наибольшую ценность при подозрении на ОИМ? Абсолютные (Δ) или относительные ($\Delta\%$)?

Проспективное исследование. 836 пациентов, поступивших с подозрением на ОИМ. При поступлении и через 1 и 2 ч измеряли уровни: 1) hs-cTnT Elecsys 2010 Roche Diagnostics, НПО — 0,003 мкг/л, 99-я перцентиль — 0,014 мкг/л, и 2) cTnI-ultra (ADVIA Centaur Siemens), НПО — 0,006 мкг/л, 99-я перцентиль — 0,04 мкг/л. Показано, что для диагностики ОИМ значения AUC ROC для абсолютных значений дельты (за 2 ч) были значительно выше, чем таковые для относительных значений, и составляли 0,95 против 0,72 соответственно. Погораничные уровни для абсолютных значений дельты (за 2 ч) составляли: для hs-cTnT — 0,07 мкг/л, а для cTnI-ultra — 0,02 мкг/л. Авторы считают, что *«абсолютные значения изменения уровней тропонинов имеют значительно более высокую диагностическую точность для диагностики ОИМ, чем относительные изменения, и поэтому должны быть предпочтительным критерием для различения между ОИМ и другими причинами подъема cTn»* [57].

В целом, согласно текущим представлениям, чем выше абсолютные значения дельты, измеренные в течение 1–3 ч после поступления пациента с ОКС, тем выше вероятность, что это ОИМ [19, 57].

Hs-cTn после ОКС

1092 стабилизированных пациента, перенесших ОКС Б ST. Измерение проводилось через 6 недель и затем через 3 и 6 мес. после перенесенных эпизодов. Наблюдение — 5 лет. Через 6 недель повышенный hs cTnI ($>0,01$ мкг/л) найден у 48% пациентов, через 6 месяцев у 36%, у 26% пациентов hs-cTnI обнаруживался при всех трех измерениях. Оказалось, что повышенный hs-cTnI был положительно связан с возрастом и с сердечно-сосудистыми рисками. Наиболее клинически полезным был пограничный уровень, равный $0,01$ мкг/л, который прогнозировал летальность с отношением рисков, равным 2,1. Авторы полагают, что «у пациентов, стабилизированных после эпизода ОКС Б ST, с помощью высокочувствительного измерения обнаруживаются персистирующие малые повышения уровней cTnT. Уровни hs-cTnI $>0,01$ мкг/л предсказывают летальность в долгосрочном периоде. Наши результаты подчеркивают необходимость дальнейшего тестирования hs-cTnI у пациентов, перенесших ОКС Б ST и выписанных из госпиталя» [58].

Каков, однако, механизм, приводящий к повышению hs-cTnI у пациентов, стабилизированных после эпизода ОКС?

898 пациентов, стабилизированных после ОКС, hs-cTnI измеряли через 6 недель, через 3 и 6 месяцев после ОКС. Одновременно измеряли NT-проBNP, а также маркеры воспаления и коагуляции. Наблюдение — 5 лет. Персистенция повышенных уровней hs-cTnI ($>0,1$ мкг/л) в течение всех трех измерений наблюдалась у 233 (26%) пациентов. Обнаружена сильная связь между уровнями NT-проBNP и hs-cTnI, однако связи между уровнями cTnI и маркерами воспаления и коагуляции не было. Авторы полагают, что «после перенесенных ОКС повышенные персистирующие уровни hs-cTnI связаны преимущественно с нарушенной функцией ЛЖ» [59].

144 пациента, поступили с острой сердечной недостаточностью. hs-cTnT измеряли при поступлении, при нахождении в госпитале, при выписке и в течение 90 дней после нее. При выписке с уровнями hs-cTnT $>23,35$ нг/л наблюдался повышенный риск повторной госпитализации и кардиоваскулярной летальности [60].

Hs-cTn: один или в комплексе с другими кардиомаркерами?

94 пациента с подозрением на ОКС Б ST, разделены на группы с ранним поступлением (<4 ч) и с поздним (≥ 4 ч). Количество проанализированных проб на каждого пациента — от 2 до 8. Измеряли: тропонины — высокочувствительный и «обычный», миоглобин и h-FABP (кардиальный блок, связывающий свободные жирные кислоты). Наилучшим ранним предиктором ИМ Б ST был hs-cTn. Авторы считают, что «отличная диагностическая точность исходных уровней hs-cTnT может в бу-

дущем избавить от необходимости использовать другие ранние маркеры некроза» [61].

293 пациента, поступивших с признаками ОКС, hs-cTnT и H-FABP измеряли при поступлении в течение 24 ч. Значения AUC ROC, указывающие на развитие повреждения миокарда, составляли: 1) для измеренных в течение первых 6 часов для hs-cTnT — 0,908, для H-FABP — 0,855; 2) для измеренных в течение 6–24 ч для hs-cTnT — 0,995 и для H-FABP — 0,848. Статистический анализ показал, что измерение hs-cTnT, но не H-FABP, предсказывало неблагоприятные исходы как у всех пациентов (отношение рисков — 3,02), так и у поступивших позже, чем через 6 ч (отношение рисков — 2,92). Авторы заключают: «в эру высокочувствительного определения cTnI H-FABP не дает дополнительной информации о пациентах, поступивших даже через 6 ч после ОИМ» [62].

Копептин — гликопептид из 39 аминокислот, является С-концевой частью прогормона вазопрессина, секретируется в количестве, эквивалентном вазопрессину, связан с тяжестью миокардиальной ишемии, считается независимым от традиционных факторов риска предиктором смерти и сердечной недостаточности.

Наблюдались пациенты, поступившие с сердечной болью, исходно, согласно «обычному» тропонину, все были «тропонин-отрицательными» (сTnT $<0,03$ мкг/л). Исходные уровни копептина у пациентов без развития ОКС достоверно не отличались от таковых у пациентов с развитием ОКС (диагностирован с помощью КТА). Во всех случаях повышение hs-cTnT происходило раньше, чем повышение копептина. Авторы считают, что «среди пациентов, поступивших с острой сердечной болью и низким риском ОКС, концентрации копептина не являлись независимым предиктором ОКС и не добавляли диагностической информации по отношению к таковой для hs-cTnT» [63].

Hs-cTn: реальная клиническая польза

Действительно, приведет ли на практике снижение пограничных уровней hs-cTn к реальной клинической пользе?

Наблюдали пациентов, поступивших с ОКС. В первой фазе исследования (1 февраля – 31 июля 2008 г.) наблюдали 1038 пациентов, пограничный уровень hs-cTnT для выявления миокардиального некроза составлял 0,20 нг/мл. Этот уровень полагали «ИМ положительным», о чем и сообщали кардиологу.

Во второй фазе (1 февраля 2009 – 31 июля 2009 г.) наблюдали 1054 пациентов, пограничный уровень hs-cTnT для выявления миокардиального некроза был снижен в 4 раза: с 0,20 до 0,05 нг/мл. Этот уровень считали «ИМ положительным» и сообщали кардиологу.

Все пациенты согласно исходным уровням hs-cTnT были разделены на три группы: 1) $<0,05$, 2) $0,05$ – $0,19$ и 3) $\geq 0,20$ нг/мл. В течение одного года фиксировались:

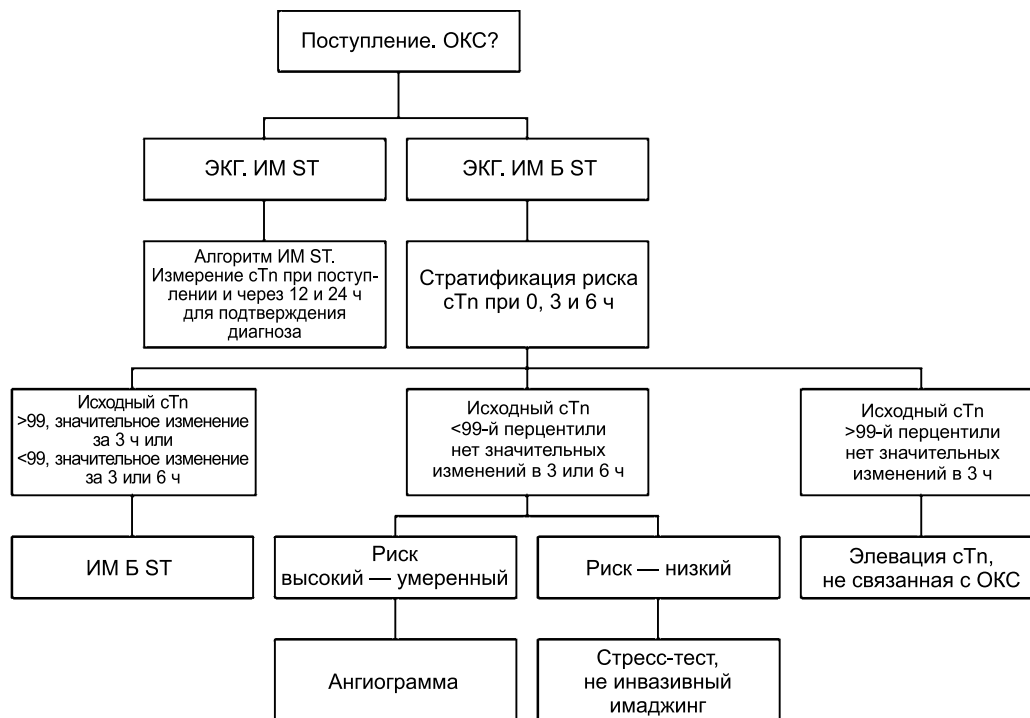


Рис. 5. Алгоритмы измерения и интерпретации hs-cTn у пациентов, поступивших с подозрением на ОКС и с патологической картиной ЭКГ [7]

1) отсутствие неблагоприятных событий, 2) повторные ИМ, 3) кардиоваскулярная смерть.

В первой фазе исследования (пограничный уровень — 0,2 нг/л) в течение одного года повторные ИМ или смерть были зафиксированы: 1) у 7% пациентов с cTnT < 0,05; 2) у 39% пациентов с cTnT от 0,05 до 0,19; 3) у 24% пациентов с cTnT > 0,20.

Во второй фазе (пограничный уровень — 0,05 нг/л) в течение одного года повторные ИМ или смерть были зафиксированы: 1) у 5% пациентов с hs-cTnT < 0,05; 2) с hs-cTnT от 0,05–0,19 у 21% пациентов, 3) с hs-cTnT > 0,20 у 24% пациентов.

Наибольший положительный клинический эффект, выразившийся в снижении повторных ИМ и смертности с 39% до 21%, применение hs-cTnT имело для пациентов с уровнями тропонинов, которые ранее считались ниже пограничных. Авторы полагают, что «применение hs-cTnT для пациентов с подозрением на ОКС повышает количество диагнозов ИМ и выявляет пациентов с высоким риском повторного ИМ или смерти. Снижение диагностического уровня hs-cTnT связано с большим снижением морбидности и смертности» [64].

Алгоритмы измерения hs-cTn у пациентов, поступивших с подозрением на ОКС

Каковы рациональные алгоритмы измерения hs-cTn при разных картинах ЭКГ? Пока официальных рекомендаций нет, но первые предложения уже появились (рис. 5 и 6) [7].

Клиническое значение измерения hs-cTn

1. Для наибольшей клинической эффективности уровни hs-cTn должны интерпретироваться как количественные переменные. Терминов «тропонин-отрицательный» и «тропонин-положительный» следует избегать.
2. Повышение, постоянный уровень и/или снижение уровней hs-cTn дифференцируют острый некроз кардиомиоцитов от хронического.
3. Дифференциальная диагностика случаев, связанных с некрозом *небольшого* количества кардиомиоцитов и с *небольшим* повышением тропонинов, включает *широкий спектр* различных патологий, отражающий хронические и острые кардиальные нарушения.
4. Дифференциальная диагностика случаев, связанных с некрозом *большого* количества кардиомиоцитов и с *существенным* повышением тропонинов, связана с более *узким* спектром патологий, ограниченных ОИМ, миокардитами и кардиомиопатией Такоцубо [1, 5–8].

В целом, значение повышенных уровней hs-cTn можно суммировать так:

- 1) в общей популяции hs-cTn выявляет лиц с повышенным риском *структурных* заболеваний миокарда и риском смертности от всех причин;
- 2) короткий период ишемии, не связанный с явным ИМ, вызывает высвобождение небольшого количества hs-cTn;
- 3) при стабильных заболеваниях коронарных артерий уровни hs-cTn связаны с риском кардиоваскуляр-

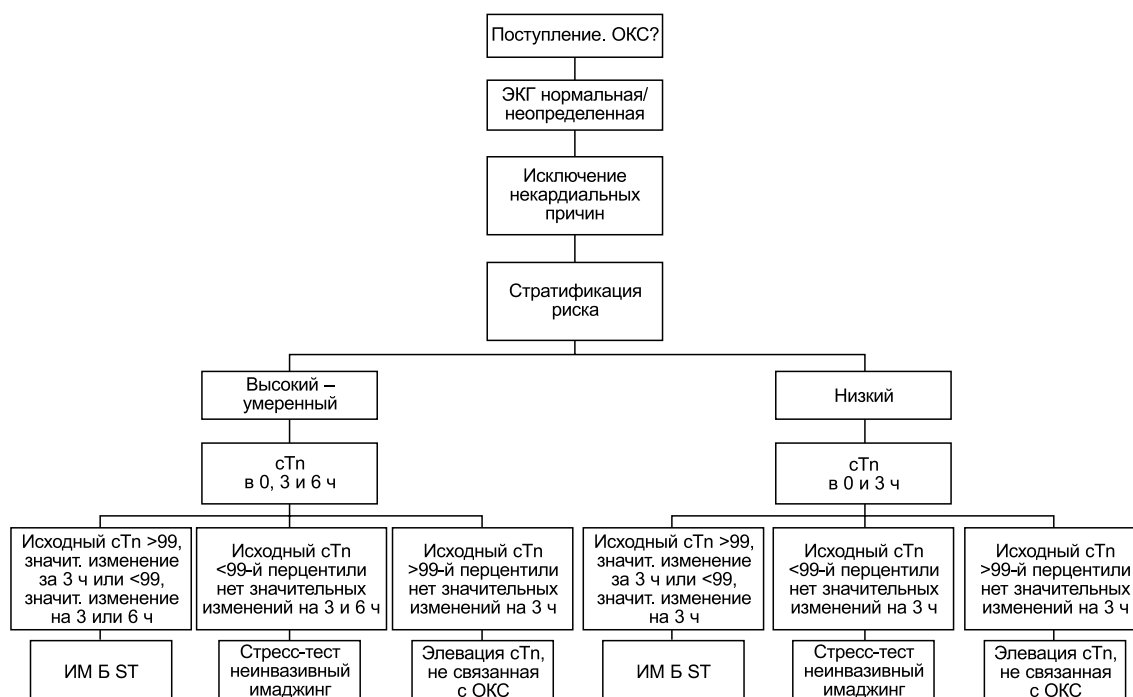


Рис. 6. Алгоритмы измерения и интерпретации hs-cTn у пациентов, поступивших с подозрением на ОКС и с нормальной или не интерпретируемой картиной ЭКГ [7]

ной смерти и сердечной недостаточности, но не с риском ИМ;

4) у пациентов с симптомами ОКС hs-cTn — это ранний маркер ИМ, который, по сравнению со «стандартным сТп», выявляет большее количество пациентов с повреждением миокарда и является независимым предиктором неблагоприятных исходов;

5) с помощью серийного измерения hs-cTn диагноз ИМ можно исключить уже в первые часы после поступления;

6) для диагностики ИМ абсолютные значения динамики концентрации hs-cTn имеют более высокую точность, чем относительные значения;

7) повышенные после ОКС уровни hs-cTn преимущественно связаны с дисфункцией ЛЖ;

8) снижение hs-cTnT связано со снижением morbidity и смертности.

9) при измерении hs-cTn нет необходимости измерения других кардиальных биомаркеров.

Таблица 3. Диагностическое значение уровней hs-cTnT [65]

hs-cTnT, концентрация (нг/мл)	Клиническое значение
10	Очень обширный ОИМ, миокардит
1	Обширный ОИМ, миокардит
0,1	Малый ОИМ, ранний обширный ОИМ, миокардит, Такоцубо (гипертрофия ЛЖ), критические заболевания
0,05	Микро-ИМ, ранний обширный ОИМ, миокардит, Такоцубо, легочная эмболия, застойная сердечная недостаточность, гипертонический криз, стабильное заболевание коронарных артерий
0,014	Пограничный уровень
0,010	Стабильная стенокардия, застойная сердечная недостаточность, субклиническая болезнь сердца и т. п.
0,005	Норма

Примечание. У разных hs cTn тестов значения НПО, 99-й перцентили, CV, нормальных и диагностических уровней могут различаться.

Клиническое значение hs-cTn в кабинете врача и в амбулатории

Полагается, что измерение hs-cTn может быть относительно недорогим подходом для скрининга асимптомных структурных ССЗ в кабинете врача (doctor office). Как известно, вклад в повышение тропонинов могут давать как ренальные заболевания, так и другие патологические состояния, включая и еще неизвестные. Поэтому в амбулаторных условиях hs-cTn может играть роль неспецифического маркера, отражающего степень кардиального повреждения, вызываемого различными и, возможно, множественными патологическими механизмами [66].

В амбулатории измерение hs-cTn может быть указанием для проведения дополнительной диагностики, желательно с помощью кардиоваскулярного имаджинга, в большей степени направленного на обнаружение структурных кардиальных заболеваний, чем на обнаружение атеросклероза. Такой комплексный подход должен привести к выявлению источника хронического кардиоваскулярного повреждения и к выработке рациональной стратегии терапии, учитывающей конкретный патофизиологический механизм. С развитием ультразвуковых технологий уже стало возможным с помощью ручных инструментов непосредственно в кабинете врача снимать эхокардиограмму у пациентов с повышенными hs-cTn [66].

В целом, внедрение hs-cTn в амбулаторную практику считается полезным, так как может улучшить первичную и вторичную профилактику ССЗ. Основная проблема при этом — разработка алгоритма включения этого теста в программы массового скрининга как в общей популяции, так и среди лиц, имеющих как установленные ССЗ, так и другие заболевания, связанные с сердечно-сосудистыми осложнениями.

Клиническое значение hs-cTn в ОНТ

Патофизиология ОИМ включает в себя не только: 1) разрыв коронарных бляшек, что ведет к снижению снабжения миокарда кислородом (ОИМ, I тип), но и 2) состояния, связанные с повышенной потребностью в кислороде (ОИМ, II тип), сопряженные, например, с сепсисом, гипертоническим кризом, с фибрилляцией предсердий, но не связанные с доминирующим атеросклерозом. Полагается, что широкое внедрение hs-cTn приведет к большей частоте положительных диагнозов ОИМ, в особенности ОИМ II типа, характеризующегося повышением потребности в кислороде, отсутствием разрывов бляшек и тромбоза сосудов. В данный момент неизвестно, принесет ли пользу таким пациентам агрессивная терапия, включающая ингибирование агрегации тромбоцитов и применение антикоагулянтов [66].

В целом, клинические преимущества измерения hs-cTn таковы:

1. Более быстрая постановка диагноза ОИМ должна снизить смертность за счет:
 - а) раннего проведения реваскуляризации,
 - б) более раннего перевода пациента в отделение неотложной кардиальной терапии,
 - в) более раннего начала других мероприятий, применяемых при ОИМ.
2. Более быстрое и более надежное исключение диагноза ОИМ.
3. Сочетание результатов hs-cTn тестов с анализом клинической картины и данных ЭКГ может значительно снизить долю пациентов с клинической неопределенностью, которые в ином случае нуждались бы:
 - а) в непрерывном мониторинге ЭКГ и
 - б) в серийном (через 6 и 9 ч) отборе проб для определения традиционных маркеров повреждения миокардиальных клеток.
4. Экономия средств, связанная с точностью раннего установления или исключения диагноза ИМ [1, 5–8, 65, 66].

hs-cTn и кардиологи: новые возможности и новые проблемы

Как зарубежные кардиологи отнеслись к тому, что теперь все стали «тропонин-положительными»? Если не отрицательно, то с большой настороженностью.

Вот, например, заголовки некоторых статей, опубликованных в серьезных академических журналах: «Высококочувствительное измерение тропонина: *quo vadis?*»¹ [67], «Высококочувствительные тропонины? Ответ или только больше вопросов?» [68], «Высококочувствительные кардиальные тропонины: надувательство, польза и реальность» [69], «Высококочувствительный кардиальный тропонин: друг или враг?» [65], «Риски, ловушки и благоприятные возможности, связанные с использованием высококочувствительных кардиальных тропонинов» [70], «Высококочувствительные измерения тропонинов и сообщество кардиологов: отношение любовь/ненависть?» [66].

О чем же говорят эти статьи? Если кратко — о новых и, пожалуй, революционных возможностях, связанных с hs-cTn, и о «подводных камнях», лежащих на пути их широкого применения, особенно если по этому пути идти в состоянии «неконтролируемого оптимизма». С одной стороны, многочисленные исследования убедительно показали, что hs-cTn значительно улучшают диф-

¹ *Quo vadis, Domine?* — лат. *Куда ты идешь, Господи?* Когда после уничтожения Нероном христиан ап. Петр в страхе покинул Рим, на Аппиевой дороге ему явился Христос. *Quo vadis, Domine?* — спросил ап. Петр. *Eo 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 живет, туда ли идет по жизни, верны ли его жизненные цели, ценности и т. п. (прим. авт.)

ференциальную диагностику стабильной и нестабильной стенокардии, ОКС и разных типов ИМ, притом в первые часы, после поступления с сердечным приступом. При этом диагностическая польза от повышенной чувствительности превосходит недостатки, связанные с пониженной специфичностью. С другой стороны, несмотря на эти, казалось бы, вдохновляющие возможности, практикующие кардиологи, как оказалось, восприняли hs-cTn «со значительным беспокойством» [в подлиннике *with considerable trepidation; trepidation* — трепет, дрожь, тревога, беспокойство, прим. авт., 66].

Почему?

Во-первых, снижение пограничных уровней для раннего выявления ОКС и разных типов ИМ еще не включено в официальные рекомендации.

Вторая трудность — высокая чувствительность hs-cTn тестов может привести к большому количеству ложноположительных диагнозов. Не приведет ли это к тому, что клиницисты будут относиться к высокочувствительным тропонинам с большой долей скептицизма, тем более что «старые добрые» тропониновые тесты просты для интерпретации, как «черное–белое»? В течение многих лет клиническое применение cTn было простым и бескомпромиссным. Повышенный cTn рассматривался как эквивалент диагноза ИМ и был обоснованием для соответствующих клинических решений: для антитромботической и антикоагуляционной терапии, для перевода пациента в отделение коронарной терапии, для консультации с кардиологом о необходимости проведения ранней коронарной ангиографии. Теперь плата за высокую чувствительность — компромисс между несомненной пользой выявления ИМ в самые первые часы его развития и тем, что в действительности такое повышение hs-cTn может быть вызвано не ИМ, а, например, неишемическим некрозом кардиомиоцитов, который, в свою очередь, может быть связан с большим количеством других патологий [71].

Уж не проще ли использовать традиционно высокие пограничные уровни, имеющие большую специфичность по отношению к ОИМ? Однако такой подход, как особо подчеркивается: «*хотя и делает жизнь кардиологов легкой, но подвергает опасности жизнь пациентов с ранними ОИМ или с другими случаями некроза миоцитов, которые при традиционных пограничных уровнях cTn останутся незамеченными*» [65].

Хотя отрицательные предиктивные значения снижения или постоянства уровней hs-cTn по отношению к ИМ доказаны весьма четко и это означает, что большее количество пациентов могут быть выписаны из ОНТ, необходимость интерпретации клинических причин таких сценариев вызывает у кардиологов серьезную озабоченность. Как осторожно пишут некоторые авторы: «*мы подозреваем, что многие отделения неотложной терапии будут испытывать дискомфорт при обращении с пациентами, у которых концентрации тропонинов будут находиться ниже уровня, пограничного для ИМ*» [66].

В частности, наибольшее «беспокойство» (в подлиннике *consternation* — ужас; испуг; оцепенение от страха — прим. авт.) у кардиологов из ОНТ вызывают: 1) необходимость быстрой интерпретации причины повышенных тропонинов у лиц, не имеющих четких симптомов острой ишемии, и поэтому 2) необходимость обращения за помощью к «консультирующему» специалисту из кардиологического отделения. А «консультирующий» кардиолог часто воспринимает просьбу о такой помощи как «откровенное» перекалывание медицинской юридической ответственности из ОНТ на плечи консультирующего кардиолога [66]. Действительно, в настоящее время по крайней мере 60–70% лиц, ежедневно поступающих в американские ОНТ с сердечными приступами, имеют определяемые концентрации тропонинов. И если все такие лица будут направляться к консультирующему кардиологу, который, к тому же, будет назначать дополнительные тесты, непрямые экономические затраты (и потенциальный вред для пациентов, вызванный ненужным тестированием) могут быть значительными [66].

Ясно, что внедрение в широкую практику hs-cTn — это серьезный вызов, как для кардиологов, так и для тех, кто должен организовывать взаимодействие между ОНТ и кардиологическим отделением.

Итак, несомненно, что широкое применение высокочувствительных тропонинов принесет несомненную пользу широкому спектру лиц, от тех, кто имеет субклинические кардиальные патологии, и до тех, кто поступает в отделение неотложной терапии.

Но одновременно высокочувствительные тропонины могут осложнить жизнь кардиологам, которые теперь обязаны видеть не только «черное и белое», но все цвета спектра сердечно-сосудистых патологий.

«Тропонин-отрицательных» больше нет. И уже никогда не будет.

Благодарности. Автор считает своей приятной обязанностью поблагодарить д. м. н. проф. А. Ж. Гильманова (Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа) за большую помощь, оказанную при подготовке данной статьи. Автор благодарит О. И. Резникову (ЗАО «ДИАКОН») за помощь в работе над текстом.

Литература

1. Apple F. S. A new season for cardiac troponin assays: It's time to keep a scorecard [Opinion]. Clin. Chem. 2009; 55: 1303–1306.
2. Bassand J. P., Hamm C. W., Ardissino D. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. Eur. Heart J. 2007; 28 (13): 1598–1660.
3. Wallace T. W., Abdullah S. M., Drazner M. H. et al. Prevalence and determinants of troponin t elevation in the general population. Circulation. 2006; 113: 1958–1965.
4. Morrow D. A., Cannon C. P., Jesse R. L. et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilisation of biochemical markers in acute coronary syndromes. Clin. Chem. 2007; 53: 552–574.

5. *Daubert M. A., Jeremias A.* The utility of troponin measurement to detect myocardial infarction: review of the current findings. *Vasc. Health Risk Manag.* 2010; 6: 691–699.
6. *Christenson R. H., Phillips D.* Sensitive and high sensitivity next generation cardiac troponin assays: more than just a name. *Pathology.* 2011; 43 (3): 213–219.
7. *Collinson P. O.* Sensitive troponin assays. *J. Clin. Pathol.* 2011, Jun 24.
8. *Baker J. O., Reinhold J., Redwood S.* et al. Troponins: redefining their limits. *Heart.* 2011; 97 (6): 447–445.
9. *Todd J., Freese B., Lu A.* et al. Ultrasensitive flow-based immunoassays using single-molecule counting. *Clin. Chem.* 2007; 53: 1990–1995.
10. *Wu A. H. B., Lu A., Freese B.* et al. Development and preliminary clinical validation of an ultrasensitive assay for cardiac troponin using microparticle based immunoassay and single molecule counting [Abstract]. *Clin. Chem.* 2007; 53 (6): 15.
11. *Wu A. H. B., Agce S. J., Lu Q. A.* et al. Specificity of a high-sensitivity cardiac troponin I assay using single-molecule-counting technology. *Clin. Chem.* 2009; 55: 196–198.
12. *Wu A. H., Lu Q. A., Todd J.* et al. Short- and long-term biological variation in cardiac troponin I measured with a high-sensitivity assay: implications for clinical practice. *Clin. Chem.* 2009; 55: 52–58.
13. *Venge P., Johnston N., Lindahl B.* et al. Normal plasma levels of cardiac troponin I measured by the high-sensitivity cardiac troponin I access prototype assay and the impact on the diagnosis of myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 54: 1165–1172.
14. *Eggers K. M., Jaffe A. S., Lind L.* et al. Value of cardiac troponin I cut-off concentrations below the 99th percentile for clinical decision making. *Clin. Chem.* 2009; 55: 88–92.
15. *Koerbin G., Tate J. R., Hickman P. E.* Analytical characteristics of the Roche highly sensitive troponin T assay and its application to a cardio-healthy population. *Ann. Clin. Biochem.* 2010; 47: 524–528.
16. *French J. K., White H. D.* Clinical implications of the new definition of myocardial infarction. *Heart.* 2004; 90: 99–106.
17. *Bergmann O., Bhardwaj R. D., Bernard S.* et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009; 324: 98–102.
18. *Korosoglou G., Lehrke S., Mueller D.* et al. Determinants of troponin release in patients with stable coronary artery disease: insights from CT angiography characteristics of atherosclerotic plaque. *Heart.* 2011; 97 (10): 823–831.
19. *de Lemos J. A., Drazner M. H., Omland T.* et al. Association of troponin T detected with a highly sensitive assay and cardiac structure and mortality risk in the general population. *JAMA.* 2010; 304: 2503–2512.
20. *de Filippi C. R., de Lemos J. A., Christenson R. H.* et al. Association of serial measures of cardiac troponin T using a sensitive assay with incident heart failure and cardiovascular mortality in older adults. *JAMA.* 2010; 304: 2494–2502.
21. *Saunders J. T., Nambi V., de Lemos J. A.* et al. Cardiac troponin T measured by a highly sensitive assay predicts coronary heart disease, heart failure, and mortality in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation.* 2011; 123: 1367–1376.
22. *Sabatine M. S., Morrow D. A., de Lemos J. A.* et al. Detection of acute changes in circulating troponin in the setting of transient stress test-induced myocardial ischaemia using an ultrasensitive assay: results from TIMI 35. *Eur. Heart J.* 2009; 30 (2): 162–169.
23. *Turer A. T., Addo T. A., Martin J. L.* et al. Myocardial ischemia induced by rapid atrial pacing causes troponin T release detectable by a highly sensitive assay insights from a coronary sinus sampling study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 57 (24): 2398–2405.
24. *Mingels A., Jacobs L., Michielsen E.* et al. Reference population and marathon runner sera assessed by highly sensitive cardiac troponin T and commercial cardiac troponin T and I assays. *Clin. Chem.* 2009; 55 (1): 101–108.
25. *Saravia S. G., Knebel F., Schroeckh S.* et al. Cardiac troponin T release and inflammation demonstrated in marathon runners. *Clin. Lab.* 2010; 56 (1–2): 51–58.
26. *Scherr J., Braun S., Schuster T.* et al. 72-h kinetics of high-sensitive troponin T and inflammatory markers after marathon. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2011, Mar 25.
27. *Rosjo H., Andreassen J., Edvardsen T.* et al. Prognostic Usefulness of Circulating High-Sensitivity Troponin T in Aortic Stenosis and Relation to Echocardiographic Indexes of Cardiac Function and Anatomy. *Am. J. Cardiol.* 2011, Apr. 27.
28. *Eggers K. M., Nygren M., Venge P.* et al. High-sensitive troponin T and I are related to invasive hemodynamic data and mortality in patients with left-ventricular dysfunction and precapillary pulmonary hypertension. *Clin. Chim. Acta.* 2011, May.
29. *Omland T., de Lemos J. A., Sabatine M. S.* et al. A sensitive cardiac troponin T assay in stable coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 2538–2547.
30. *Ndrepepa G., Braun S., Mehilli J.* et al. Prognostic value of sensitive troponin T in patients with stable and unstable angina and undetectable conventional troponin. *Am. Heart J.* 2011; 161 (1): 68–75.
31. *Laufer E. M., Mingels A. M., Winkens M. H.* et al. The extent of coronary atherosclerosis is associated with increasing circulating levels of high sensitive cardiac troponin T. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010; 30 (6): 1269–1275.
32. *Latini R., Masson S., Anand I. S.* et al. Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure. *Circulation.* 2007; 116 (11): 1242–1249.
33. *Kawahara C., Tsutomoto T., Nishiyama K.* et al. Prognostic role of high-sensitivity cardiac troponin T in patients with non ischemic dilated cardiomyopathy. *Circ. J.* 2011; 75 (3): 656–661.
34. *Wilson S. R., Sabatine M. S., Braunwald E.* et al. Detection of myocardial injury in patients with angina using a novel nanoparticle cardiac troponin I assay: observations from the PROTECT-TIMI 30 Trial. *Am Heart J.* 2009; 158 (3): 386–391.
35. *Melanson S. E., Morrow D. A., Jarolim P.* Earlier detection of myocardial injury in a preliminary evaluation using a new troponin I assay with improved sensitivity. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 128 (2): 282–286.
36. *Apple F. S., Smith S. W., Pearce L. A.* et al. Use of the Centaur TnI-Ultra assay for detection of myocardial infarction and adverse events in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome. *Clin. Chem.* 2008; 54 (4): 723–728.
37. *Kavsak P. A., MacRae A. R., Yerna M. J.* et al. Analytic and clinical utility of a next-generation, highly sensitive cardiac troponin I assay for early detection of myocardial injury. *Clin. Chem.* 2009; 55 (3): 573–577.
38. *Reichlin T., Hochholzer W., Bassetti S.* et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 858–867.
39. *Januzzi J. L. Jr, Bamberg F., Lee H.* et al. High-sensitivity troponin T concentrations in acute chest pain patients evaluated with cardiac computed tomography. *Circulation.* 2010; 121 (10): 1227–1234.
40. *Christ M., Popp S., Pohlmann H.* et al. Implementation of high sensitivity cardiac troponin T measurement in the emergency department. *Am. J. Med.* 2010; 123 (12): 1134–1142.
41. *Bonaca M., Scirica B., Sabatine M.* et al. Prospective evaluation of the prognostic implications of improved assay performance with

- a sensitive assay for cardiac troponin I. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010 11; 55 (19): 2118–2124.
52. *Lindahl B., Venge P., James S.* The new high-sensitivity cardiac troponin T assay improves risk assessment in acute coronary syndromes. *Am. Heart J.* 2010; 160: 224–229.
53. *Melki D., Lind S., Agewall S.* et al. Diagnostic value of high sensitive troponin T in chest pain patients with no persistent ST-elevations. *Scand. Cardiovasc. J.* 2011, Mar 24.
54. *Aldous S. J., Florkowski C. M., Crozier I. G.* et al. High sensitivity troponin outperforms contemporary assays in predicting major adverse cardiac events up to two years in patients with chest pain. *Ann. Clin. Biochem.* 2011; 48 (Pt 3): 249–255.
55. *Weber M., Bazzino O., Navarro Estrada J. L.* et al. Improved diagnostic and prognostic performance of a new high-sensitive troponin T assay in patients with acute coronary syndrome. *Am. Heart J.* 2011; 162 (1): 81–88.
56. *Ndrepepa G., Braun S., Schulz S.* et al. Comparison of prognostic value of high-sensitivity and conventional troponin T in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Clin. Chim. Acta.* 2011; 412 (15–16): 1350–1356.
57. *Reiter M., Twerenbold R., Reichlin T.* et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction in the elderly using more sensitive cardiac troponin assays. *Eur. Heart J.* 2011, Feb 28.
58. *Morrow D. A., Cannon C. P., Jesse R. L.* et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2007; 115: 356–375.
59. *Wu A. H. B., Jaffe A. S., Apple F. S.* et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines: use of cardiac troponin and B-type natriuretic peptide or N-terminal pro-B-type natriuretic peptide for etiologies other than acute coronary syndromes and heart failure. *Clin. Chem.* 2007; 53: 2086–2096.
60. *Thygesen K., Alpert J. S., White H. D.* Universal definition of myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50: 2173–2195.
61. *Casals G., Filccla X., Auge J. M.* et al. Impact of ultrasensitive cardiac troponin I dynamic changes in the new universal definition of myocardial infarction. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008; 130: 964–968.
62. *Wu A. H. B., Jaffe A. S.* The clinical need for high-sensitivity cardiac troponin assays for acute coronary syndromes and the role for serial testing. *Am. Heart J.* 2008; 155: 208–214.
63. *James S., Armstrong P., Califf R.* et al. Troponin T levels and risk of 30-day outcomes in patients with the acute coronary syndrome: prospective verification in the GUSTO-IV trial. *Am. J. Med.* 2003; 115: 178–184.
64. *Keller T., Zeller T., Pctz D.* et al. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 868–877.
65. *Giannitsis E., Becker M., Kurz K.* et al. High-sensitivity cardiac troponin T for early prediction of evolving non-ST-segment elevation myocardial infarction in patients with suspected acute coronary syndrome and negative troponin results on admission. *Clin. Chem.* 2010; 56: 642–650.
66. *Kavsak P. A., MacRac A. R., Newman A. M.* et al. Effects of contemporary troponin assay sensitivity on the utility of the early markers myoglobin and CKMB isoforms in evaluating patients with possible acute myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta.* 2007; 380: 213–216.
67. *Apple F. S., Smith S. W., Pearce L. A.* et al. Use of the bioMérieux VIDAS troponin I ultra assay for the diagnosis of myocardial infarction and detection of adverse events in patients presenting with symptoms suggestive of acute coronary syndrome. *Clin. Chim. Acta.* 2008; 390 (1–2): 72–75.
68. *Giannitsis E., Kurz K., Hallermayer K.* et al. Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay. *Clin. Chem.* 2010; 56 (2): 254–261.
69. *Reichlin T., Irfan A., Twerenbold R.* et al. Utility of Absolute and Relative Changes in Cardiac Troponin Concentrations in the Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* 2011; 124: 136–145.
70. *Thygesen K., Mair J., Katus H.* et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur. Heart J.* 31 (18): 2197–2204.
71. *Eggers K. M., Lagerqvist B., Venge P.* et al. Persistent cardiac troponin I elevation in stabilized patients after an episode of acute coronary syndrome predicts long-term mortality. *Circulation.* 2007; 116 (17): 1907–1914.
72. *Eggers K. M., Lagerqvist B., Oldgren J.* et al. Pathophysiologic mechanisms of persistent cardiac troponin I elevation in stabilized patients after an episode of acute coronary syndrome. *Am. Heart J.* 2008; 156 (3): 588–594.
73. *Xue Y., Clopton P., Peacock W. F.* et al. Serial changes in high-sensitive troponin I predict outcome in patients with decompensated heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2011; 13 (1): 37–42.
74. *Kurz K., Giannitsis E., Becker M.* et al. Comparison of the new high sensitive cardiac troponin T with myoglobin, h-FABP and cTnT for early identification of myocardial necrosis in the acute coronary syndrome. *Clin. Res. Cardiol.* 2011; 100 (3): 209–215.
75. *Ilva T., Lund J., Porela P.* Early markers of myocardial injury: cTnI is enough. *Clin. Chim. Acta.* 2009; 400 (1–2): 82–85.
76. *Karakas M., Januzzi J. L. Jr, Meyer J.* et al. Copeptin Does Not Add Diagnostic Information to High-Sensitivity Troponin T in Low-to Intermediate-Risk Patients with Acute Chest Pain: Results from the Rule Out Myocardial Infarction by Computed Tomography (ROMICAT) Study. *Clin. Chem.* 2011, Jun 14.
77. *Mills N. L., Churchhouse A. M., Lee K. K.* et al. Implementation of a sensitive troponin I assay and risk of recurrent myocardial infarction and death in patients with suspected acute coronary syndrome. *JAMA.* 2011; 305 (12): 1210–1216.
78. *Twerenbold R., Reichlin T., Reiter M.* et al. High-sensitive cardiac troponin: friend or foe? *Swiss Med. Wkly.* 2011; 141: 1–5.
79. *de Lemos J. A., Morrow D. A., Defilippi C. R.* Highly Sensitive Troponin Assays and the Cardiology Community: A Love/Hate Relationship? *Clin. Chem.* 2011, Apr 18.
80. *Katus H. A., Giannitsis E., Jaffe A. S.* et al. Higher sensitivity troponin assays: quo vadis? *Eur. Heart J.* 2009; 30: 127–128.
81. *Hollander J. E.* Highly Sensitive Troponins: The Answer or Just More Questions? *JACC.* 2009; 54 (13): 1173–1175.
82. *Jaffe A. S., Apple F. S.* High-Sensitivity Cardiac Troponin: Hype, Help, and Reality. *Clinical Chemistry.* 2010; 56 (3): 342–344.
83. *Gaze D. C.* The Perils, Pitfalls and Opportunities of Using High Sensitivity Cardiac Troponin. *Curr. Med. Chem.* 2011, Jul 14.
84. *Kelley W. E., Januzzi J. L., Christenson R. H.* Increases of cardiac troponin in conditions other than acute coronary syndrome and heart failure. *Clin. Chem.* 2009; 55 (12): 2098–2112.

ЭНЕРГОДЕФИЦИТНЫЙ ДИАТЕЗ

**В.С. СУХОРУКОВ, Н.В. КЛЕЙМЕНОВА, Е.В. ТОЗЛИЯН,
Е.И. ШАБЕЛЬНИКОВА, В.А. БЕЛОВ, А.И. КРАПИВКИН**
ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии» Минздравсоцразвития РФ

Резюме. В статье рассматриваются проблемы распространенности патологических состояний, связанных с митохондриальной недостаточностью. Показано, что они не ограничиваются наследственными синдромами, вызываемыми мутациями генов митохондриальной ДНК. Многие другие заболевания включают в себя те или иные нарушения клеточной энергетики как вторичные звенья патогенеза. Подчеркивается актуальность разработки профилактических подходов к коррекции нарушений энергообмена. Главная предпосылка такой разработки — определение возможности предикции развития дизэнергетического состояния и выделение соответствующих критериев риска. В статье представлено и обсуждается предложенное недавно понятие «энергодифицитного диатеза» — скрытой формы относительной индивидуальной недостаточности цитоэнергетического статуса организма. Рассматриваются роль этого состояния в развитии болезней, клинические и лабораторные критерии выявления. Изложены представления о том, что, не будучи самостоятельным заболеванием, энергодифицитный диатез сказывается на характере течения других болезней, что требует коррекции применяемого лечения, а также профилактики рецидивов и осложнений. Представлены данные, подтверждающие возможность применения малоинвазивных и неинвазивных методов для выявления скрытого дефицита у детей разного возраста и взрослых. Одним из эффективных малоинвазивных методов при этом является способ цитохимического определения активности ферментов внутриклеточного энергообмена. В статье представлены соответствующие нормативные показатели, полученные авторами. Описано применение чрескожного мониторинга параметров газообмена в качестве неинвазивного метода обследования для выявления нарушений клеточного энергообмена. При этом возможность патогенетически обоснованной терапии митохондриальных заболеваний, как и возможность эффективной коррекции традиционного лечения многих болезней при снижении «энергетического фона», делает особо актуальными задачи совершенствования такой коррекции, а также разработки методов лабораторной диагностики указанных нарушений.

Ключевые слова: тканевой энергообмен, полисистемная митохондриальная недостаточность, цитохимическое выявление ферментативной активности, транскутанное мониторирование газообмена, энерготропная терапия.

ENERGY DEFICIENCY DIATHESIS

**V.S. SUKHORUKOV, N.V. KLEYMENOVA, E.V. TOZLIYAN,
E.I. SHABELNIKOVA, V.A. BELOV, A.I. KRAPIVKIN**
Federal State Budget Institution «Moscow Scientific Research Institute of Pediatrics
and Pediatric Surgery» Ministry of Health and Social Development of Russian Federation

Summary. The article discusses prevalence of pathological conditions related to mitochondrial insufficiency. It was shown that these conditions are not limited by hereditary syndromes caused by DNA mutations of mitochondrial genes. Other diseases include different impairments of cellular energy metabolism as secondary features of pathogenesis. The actuality of preventional approaches to energy exchange correction is stressed. The importance of these investigations is related to the prediction of energy imbalance conditions development and determination of respective risk criteria. The article discussed the recently proposed definition of “energy deficient diathesis” – concealed form of relative individual insufficiency of cytoenergetic status in concrete individuum. The role of this condition in diseases development, as well as clinical and laboratory criteria are mentioned. This condition is not a concrete nosological form, but its presence influence on development of other diseases and needs treatment correction as well as relapses and complications prevention. The data confirming possibility of non-invasive and minor invasive methods to reveal this condition in adults and children of different age. One of the effective “minor invasive” methods is the cytochemical determination of the activity of intracellular energy exchange enzymes. The article also presents the normal values of the mentioned indicators revealed by the authors. The use of transcutaneous monitoring of gas exchange as a non-invasive method for evaluation of cellular energy exchange. In this cases possibility of pathogenetic treatment in patients both suffering from mitochondrial diseases and other diseases in those with low “energy metabolism conditions” makes

especially actual the investigations in this field. These investigations should concern both working out the methods of diagnosis and improvement of energy metabolism correction.

Key words: *tissue energy metabolism, multisystemic mitochondrial insufficiency, cytochemical evaluation of enzymatic insufficiency, transcutaneous monitoring of gas exchange, energy related treatment.*

Данные для корреспонденции:

Сухоруков Владимир Сергеевич — д. м. н., профессор,
зав. научно-исследовательской лабораторией общей патологии
ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии» Минздравсоцразвития РФ;
тел.: +7 (495) 483-40-01, e-mail: vsukhorukov@inbox.ru

Понимание необходимости феноменологического и семантического определения представления об относительном снижении функционального потенциала митохондриального пула организма привело нас несколько лет назад к формулировке понятия «энергодифицитного диатеза» [1–3]. Базой для этого послужили исследования в области митохондриальных болезней у детей, которые убедили нас в том, что тканевые нарушения, связанные с дисбалансом клеточного энергообмена, чрезвычайно полиморфны, гораздо более распространены, чем об этом принято думать, и должны привлекать к себе внимание широкого круга клиницистов.

Нарушения клеточного энергообмена, в основе которых лежит митохондриальная недостаточность, приводят к обширному спектру клинических проявлений от умеренного повышения утомляемости до тяжелых поражений нервной, мышечной и других систем. Первые случаи нарушенного обмена веществ с доказанным нарушением функций митохондрий был описан в 1962 году [4]. Последние годы ознаменованы описанием множества нозологических форм, связанных с дефектами митохондриального генома, что и послужило основанием для выделения самостоятельной группы митохондриальных болезней, появления термина «митохондриальная медицина». Распространенность патологических состояний, связанных с митохондриальной недостаточностью, не ограничивается наследственными синдромами, вызываемыми мутациями генов митохондриальной ДНК. Широчайший круг других заболеваний включает в себя те или иные нарушения клеточной энергетики как вторичные звенья патогенеза. Возможность патогенетически обоснованной терапии митохондриальных заболеваний, как и возможность эффективной коррекции традиционного лечения многих болезней при снижении «энергетического фона», делает особо актуальными задачи совершенствования такой коррекции, а также разработки методов лабораторной диагностики указанных нарушений.

В то же время практически не исследованы возможности разработки профилактических подходов к коррекции нарушений энергообмена. Актуальность такой возможной задачи не вызывает сомнений, хотя ее трудности, особенно методологические, очевидны. Главная из них — определение возможности предикции разви-

тия дизэнергетического состояния. Известно, что одной из важнейших предпосылок в этом отношении является выделение критериев риска. То есть необходим ответ на вопрос: возможно ли формирование групп риска в отношении развития энергодифицита? Наши исследования показывают, что возможно. Вне зависимости от типа заболевания группы больных детей различаются по степени выраженности полисистемной недостаточности митохондрий. Это свидетельствует об изначально различном генетическом уровне активности клеточного энергообмена и индивидуальных различиях его изменений в ответ на действующие факторы. Мы считаем, что существуют индивидуальные особенности энергообмена на клеточном уровне, которые могут оказывать существенное влияние на физиологические процессы детского организма, на его адаптационный потенциал, а значит и на течение разнообразных заболеваний. Следовательно, учет различий в индивидуальном уровне энергетических процессов может быть существенной основой как повышения эффективности лечения, так и проведения профилактических мероприятий.

Для характеристики риска энергодифицита мы предложили понятие «энергодифицитного диатеза» — скрытой формы относительной индивидуальной недостаточности цитоэнергетического статуса организма.

Учение о диатезах, введенное в отечественную педиатрию Михаилом Степановичем Масловым и развитое впоследствии в трудах Ю.Е. Вельтищева, В.А. Таболина, И.М. Воронцова, А.В. Чебуркина, Е.В. Неудахина, Л.Г. Кузьменко, Б.А. Кобринского и других [5–8], является одной из важнейших методологических основ профилактического направления педиатрии. Энергодифицитный диатез, по нашим представлениям, должен относиться к разряду дисметаболических диатезов по классификации Ю.Е. Вельтищева.

У представлений о диатезах трудная история. Сформулированные академиком М.С. Масловым, они многократно подвергались критике и пересмотру. Часто эти пересмотры были вполне обоснованы. Накопление и углубление знаний позволяло определять многие патологические состояния как скрытые проявления того или иного заболевания, и в этих случаях термин «диатез» оказывался некорректным. Так, исчезли понятия «ревматический диатез» и «рахитический диатез»; появле-

ние новых представлений о капилляротоксикозе и гемофилии заставили пересмотреть понятие «геморрагического диатеза». Порой кажется, что прогресс знаний о нозологических формах заболеваний должен постепенно вытеснить само понятие «диатез», определяя все большее количество скрытых патологических состояний.

И все-таки принципы, сформированные М.С. Масловым, остаются актуальными и по сей день. Бурные дискуссии, не сходящие со страниц педиатрических журналов [см., например, 8], — лишнее тому подтверждение.

Еще раз подчеркнем главную характеристику понятия «диатез» — это состояние является вариантом «нормы». Это типовая особенность индивидуальной реакции организма, проявляющаяся в первую очередь (и это акцентировал уже М.С. Маслов) в особенностях энзимных реакций. Сказанное не значит, что индивидуальная вариабельность, откладывающая свой отпечаток на течение болезней, носит чисто биохимический характер. Так, например, фундаментальные работы В.Г. Штефко показали, что индивидуальная реакция на заболевание может оцениваться и на морфологическом уровне. Однако методически именно биохимические методы в настоящее время наиболее перспективны в отношении выявления тестовых характеристик диатезов, хотя, по нашему убеждению, цитохимические и гистохимические подходы с одной стороны и физиологические (функционально-диагностические) с другой могут существенно их дополнять, формируя, таким образом, полноценное основание для обозначения диагностической методологии в этой области как морфофункциональной.

Типовая особенность комплекса физиологических реакций, по сути дела, является одной из характеристик биологической системы, подчиняющейся в своем существовании законам, разработанным Эрвином Бауэром и Конрадом Уоддингтоном. Этот комплекс реакций находится в состоянии устойчивого неравновесия и фактически формирует собой то, что Уоддингтон называл «креодом». А значит, сам по себе переходить в патологическое состояние, даже представляемое как типовой патологический процесс, он не может.

Таким образом, типовая физиологическая реакция (точнее их комплекс) не может быть вариантом дебюта частного патологического процесса по определению. Поэтому идеология «диатезов» действительно актуальна. Не может не быть актуальным исследование состояний, накладывающих индивидуальный отпечаток на течение многочисленных заболеваний, отпечаток, требующий изменения подходов к лечению и профилактике.

Терминологические неясности и следующие за ними неясности в понятиях, конечно, требуют уточнения и совершенствования. Как нам кажется, каждый «диатез» может быть определен таковым при строгом соблюдении следующих условий, или, если угодно, обладать следующими характеристиками: 1) представлять собой вариант нормы; 2) должен влиять каким-то образом на те-

чение этиологически независимых от него болезней; 3) должен иметь по возможности строгие критерии выявления; 4) определение его наличия должно диктовать необходимость изменения тактики врача, определять рекомендации по профилактике тех или иных заболеваний или вариантов их течения. Эти четыре позиции должны быть учтены для каждого диатеза.

В этом отношении, как нам кажется, предлагаемая концепция энергодефицитного диатеза также актуальна. Сам по себе не представляя заболевания, он лишь является генетически обусловленным типовым вариантом индивидуальности клеточного энергообмена достаточно большого, по нашим представлениям, числа людей (не менее 15–20%).

Клинические признаки энергодефицитного диатеза

Как подчеркивалось выше, любой диатез по определению является вариантом нормы. Так как проведение углубленных исследований для выявления диатеза (в том числе энергодефицитного) у всех условно здоровых детей хотя и актуально, но практически невозможно, то необходимо определить косвенные признаки его наличия, которые помогут выявить показания для проведения уточняющих исследований.

Снижение интенсивности тканевого энергообмена может особенно сказываться на онтогенезе активно развивающихся систем, что клинически в свою очередь может проявляться тенденциями к задержке или нарушениями развития [9]. В связи с этим актуальным представляется определение признаков энергодефицитного диатеза при различных, в том числе слабовыраженных проявлениях задержки психического или физического развития.

Так как нарушение энергозависимых этапов защитных реакций организма может явиться одной из основ нарушения иммунологической резистентности [10], наличие энергодефицитного диатеза необходимо исключить у детей с повышенной частотой инфекционных заболеваний («часто болеющих детей») и у детей с предполагаемым наличием вторичных иммунодефицитных состояний.

Пониженные адаптационные возможности при скрытом энергодефиците могут также способствовать частым рецидивам хронических заболеваний, в первую очередь психоневрологических, нервномышечных, сердечнососудистых, нефроурологических, гастроэнтерологических (т. е. затрагивающих наиболее энергозависимые системы). Поэтому выявление признаков энергодефицитного диатеза актуально при хронических заболеваниях различных органов и систем, резистентных к проводимой терапии.

По нашим наблюдениям, энергодефицит часто бывает связан с различными вариантами соединительно-тканых нарушений [11–13], в связи с чем определение характеристик тканевого энергообмена является акту-

альным в случаях патологического рубцевания при заживлении ожоговых и других ран, а также при клинических признаках соединительнотканной дисплазии.

Следует отметить, что методы оценки дизэнергетических состояний могут быть полезны при проведении динамических наблюдений и подборе энерготропной терапии при болезнях и синдромах, этиопатогенетически ассоциированных с митохондриальной недостаточностью.

Обобщая вышесказанное, предлагаем список показаний для выявления энергодефицитного диатеза у детей в целях последующей коррекции лечения основных заболеваний энерготропными препаратами:

- различные (в том числе слабовыраженные) варианты задержки психического или физического развития;
- повышенная частота инфекционных заболеваний («часто болеющие дети»);
- часто рецидивирующие хронические заболевания, в первую очередь неврологические, сердечнососудистые, нефроурологические, гастроэнтерологические;
- хронические заболевания различных органов и систем, резистентные к проводимой терапии;
- вторичные иммунодефицитные состояния;
- признаки патологического рубцевания при заживлении ожоговых и других ран;
- болезни и синдромы, ассоциированные с митохондриальной недостаточностью.

Цитохимическое выявление признаков энергодефицитного диатеза

Опираясь на большой опыт, полученный профессором Р.П. Нарциссовым и его школой, и на результаты своих исследований возможности применения указанного опыта в области изучения митохондриальных заболеваний, мы давно пришли к заключению, что одним из наиболее эффективных и в то же время малоинвазивных методов диагностики полисистемных митохондриальных нарушений является способ цитохимического определения активности ферментов внутриклеточного энергообмена [14]. Именно активное применение этого метода при различных заболеваниях и в контрольных

группах помогло нам поначалу предложить понятие «энергодефицитный диатез», а затем и сформулировать его критерии. Позднее нами были исследованы в этом отношении и другие методы диагностики, мы изучаем и стараемся внедрить новые технологии, однако роль цитохимического метода в выявлении скрытых особенностей энергообмена была и остается ключевой.

Нормативы показателей активности митохондриальных ферментов для лимфоцитов представлены в таблицах 1 и 2. Умеренное отклонение какого-либо из цитохимических показателей (в том числе их коэффициентов) от представленных референтных пределов может расцениваться как доказательство наличия энергодефицитного диатеза. Отклонение показателей за пределы двух сигмальных отклонений более вероятно представляет собой лабораторное проявление митохондриальной недостаточности.

Неинвазивное выявление признаков энергодефицитного диатеза с помощью чрескожного мониторинга газообмена

Необходимость обследования широкого круга условно здоровых лиц с особой остротой ставит на повестку дня вопрос о минимизации инвазивности при проведении медицинских исследований. В связи с этим нами для изучения индивидуальных особенностей энергообмена был предложен метод с использованием чрескожного мониторинга газообмена с помощью транскутанного монитора. В качестве нагрузочной пробы мы предложили использовать лекарственный препарат Элькар производства ООО «ПИК-ФАРМА», представляющий собой 20% раствор левокарнитина, в дозе — 1 чайная ложка перорально после определения базовых уровней газообмена.

При нормальных показателях энергообмена кривая pO_2 в период со 2-й по 6-ю минуты после нагрузки умеренно повышается, а затем возвращается к базовому уровню.

Отсутствие такого повышения или снижение кривой свидетельствует об энергодефиците. Для уточнения его степени возможно продолжение мониторинга до 30 минут. Степень понижения значения pO_2 в пери-

Таблица 1. Показатели активности митохондриальных ферментов и лактатдегидрогеназы (у.е.; средние значения) в лимфоцитах периферической крови (визуальная оценка) у здоровых детей

	Возраст детей				
	Новорожденные	До 1 года	1–4 года	5–12 лет	13–18 лет
Сукцинатдегидрогеназа (СДГ)	12,7 ± 0,86	15,9 ± 0,88	16,7 ± 0,72	20,6 ± 0,83	20,1 ± 0,56
α-глицерофосфатдегидрогеназа (ГФДГ)	4,67 ± 0,84	7,8 ± 0,72	8,5 ± 0,38	12,5 ± 0,56	12,4 ± 0,48
Глутаматдегидрогеназа (ГДГ)	4,92 ± 0,75	8,0 ± 0,70	8,7 ± 0,53	12,4 ± 0,83	12,6 ± 0,80
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	12,8 ± 0,86	15,2 ± 1,67	13,1 ± 1,56	13,5 ± 1,14	13,4 ± 1,59

Таблица 2. Пределы показателей активности митохондриальных ферментов и лактатдегидрогеназы (у. е.) и их соотношений в лимфоцитах периферической крови (визуальная оценка), выход за которые позволяет предполагать наличие энергодефицита у детей

	Возраст детей				
	Новорожденные	До 1 года	1–4 года	5–12 лет	13–18 лет
Сукцинатдегидрогеназа (СДГ)	10,1–15,3	13,3–18,6	14,5–18,8	18,0–23,0	18,5–21,5
α -глицерофосфат-дегидрогеназа (ГФДГ)	2,2–7,2	5,6–9,9	7,5–9,5	11,0–14,0	11,0–14,0
Глутаматдегидрогеназа (ГДГ)	2,7–7,2	7,5–11,7	7–10	10,0–15,0	10,0–15,0
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	10,1–15,3	10,0–20,0	8,0–18,0	10,0–17,0	10,0–17,0
Коэффициент ГФДГ/СДГ (К1)	0,14–0,7	0,4–0,7	0,4–0,55	0,5–0,7	0,5–0,7
Коэффициент ГДГ/СДГ (К2)	0,18–0,7	0,4–0,75	0,4–0,65	0,6–0,8	0,6–0,8
Коэффициент ГФДГ/ГДГ (К3)	0,3–2,7	0,55–1,2	0,8–1,35	0,7–1,2	0,7–1,2
Коэффициент ЛДГ/СДГ (К4)	0,66–1,0	0,9–1,2	0,6–0,9	0,5–0,8	0,6–0,8

од мониторинга коррелирует, по нашим наблюдениям, с выраженностью энергодефицитного состояния.

Для подтверждения эффективности такой методики нами проведены исследования различных групп пациентов. Так, в частности, обследованы 23 ребенка с частыми обострениями хронического тонзиллита методами цитохимического выявления активности ферментов энергообмена в лимфоцитах периферической крови, а также чрескожного мониторинга параметров газообмена (pO_2 и pCO_2).

Для чрескожного измерения парциальных давлений кислорода и углекислого газа использовался транскутанный монитор ТСМ 4 производства компании Radiometer (Дания).

Наряду с неинвазивным чрескожным мониторингом парциальных давлений кислорода и углекислого газа всем детям был проведен цитохимический анализ активности лимфоцитов по Р.П. Нарциссову с определением уровня сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глутаматдегидрогеназы (ГДГ), альфа-глицерофосфатдегидрогеназы (ГФДГ).

В результате транскутанное мониторирование парциальных давлений кислорода и углекислого газа выявило, что по достижении на мониторе графического плато (базового уровня) кривой, соответствующей показателям pO_2 , и последующего проведения нагрузочной пробы лекарственным препаратом Элькар, при нормальных показателях энергообмена кривая pO_2 в период со 2-й по 6-ю минуты умеренно повышается, а затем возвращается к базовому уровню. Для уточнения характера изменения кривой степени мониторинга было продолжено до 30 минут. Корреляционный анализ параметров, полученных с помощью транскутанного мониторинга и цитохимического исследования, показал, что повышение кривой pO_2 через две минуты после

приема Элькара было прямо связано с цитохимической активностью СДГ (коэффициент корреляции: +0,62). То есть чем менее был выражен подъем кривой, тем вероятнее было относительное снижение уровня активности СДГ, что характерно для энергодефицитного диатеза. Через четыре минуты мониторинга соотношения pO_2 с активностью СДГ оставались примерно теми же, но при этом и проявлялась достоверная обратная корреляция с активностью ГФДГ (коэффициент корреляции: –0,52). Последнее соответствовало предположению о том, что такая динамика связана с наличием энергодефицитного состояния, при котором типично одновременное снижение активности СДГ и повышение активности ГФДГ (в случае энергодефицитного диатеза можно говорить о тенденции к такому понижению и повышению). Начиная с 6-й минуты мониторинга проявлялась обратная корреляция с активностью ЛДГ, которая длилась до 15 минут и более (коэффициент корреляции на пике: –0,76). То есть чем выше была активность ЛДГ, тем выраженнее снижалась кривая pO_2 после нагрузочной пробы с Элькаром. Это же подтвердилось и при оценке корреляций pO_2 с соотношением СДГ/ЛДГ: коэффициент корреляции составил +0,65.

Таким образом, отсутствие повышения или снижения кривой pO_2 вскоре после нагрузочного применения L-карнитина (Элькара) свидетельствует об энергодефиците. Степень понижения значения pO_2 в период мониторинга коррелирует с выраженностью энергодефицитного состояния.

Полученные данные подтверждают возможность применения чрескожного мониторинга параметров газообмена в качестве неинвазивного метода обследования для выявления нарушений клеточного энергообмена. Следовательно, данный метод диагностики энергодефицитных состояний весьма перспективен и после не-

которой стандартизации может быть рекомендован для внедрения в клиническую практику.

Применение энерготропных препаратов в профилактических и лечебных целях

Выявление признаков энергодефицитного диатеза диктует необходимость коррекции используемых лечебных подходов и разработки профилактических. При этом предлагается использование низкодозовых кратковременных схем применения энерготропных препаратов, представленных в Методических указаниях № 99/160 МЗ РФ от 01.03.2000 [см. 15].

Спектр потенциальных индивидуальных изменений клеточного энергообмена чрезвычайно велик (изменения различных звеньев цикла Кребса, дыхательной цепи, бета-окисления и др.). И хотя спектр энерготропных препаратов также достаточно широк, далеко не всегда имеется возможность выявить конкретное точечное повреждение митохондрий и точно подобрать подходящий лекарственный препарат. В связи с этим наиболее эффективными в широкой клинической практике могут быть комплексы энерготропных препаратов, обладающих способностью воздействовать сразу на несколько

ключевых этапов клеточного энергообмена. При этом на первое место по значимости выдвигается комплексное применение таких препаратов, как L-карнитин, коэнзим Q10, витамины группы B.

В настоящее время особенно актуально развитие целенаправленных научно-прикладных разработок, направленных на создание современных принципов энерготропного лечения (по отработке состава энерготропных комплексов, тщательному подбору доз активных веществ, определению оптимальных схем назначения, в том числе с учетом хронобиологических ритмов).

Перспективная возможность широкого применения энерготропных веществ при профилактических и реабилитационных мероприятиях свидетельствует о целесообразности постановки вопроса о необходимости расширения спектра использования энерготропных препаратов. Данный аспект требует специального анализа с привлечением не только специалистов-фармакологов, клиницистов, но и организаторов здравоохранения. Результаты наших исследований свидетельствуют в пользу целесообразности такого подхода, реализация которого позволяет повысить качество жизни у пациентов с различными заболеваниями.

Литература

1. Сухоруков В. С. Энергодефицитный диатез и болезни клеточного энергообмена у детей. Всеукраинский научный форум «Здоровье женщины и ребенка». Киев, 25 мая 2006, сборник тезисов. 2006: 18–19.
2. Царегородцев А. Д., Сухоруков В. С. Актуальные проблемы и перспективы развития диагностических технологий в педиатрии. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2006; 1: 3–9.
3. Сухоруков В. С. Энергодефицитный диатез у детей. М.: ИД «Медпрактика-М», 2009: 28.
4. Luft R., Ikkos D., Palmieri G., Ernster L., Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of non-thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *Journal Clin. Investigation*. 1962; 41: 1776–1804.
5. Вельтищев Ю. Е. Наследственное предрасположение к болезням, диатезы и пограничные состояния у детей. *Педиатрия*. 1984; 12: 3–9.
6. Кобринский Б. А. Континуум переходных состояний организма и мониторинг динамики здоровья детей. М.: Детстомиздат, 2000: 152.
7. Неудахин Е. В., Чемоданов В. В. К дискуссии о конституции человека, конституциональных типах и диатезах. *Педиатрия*. 2005; 5: 60–67.
8. Диатезы и предрасположенность к различным заболеваниям. Из материалов V Российского конгресса «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии»: открытые дискуссии по актуальным проблемам педиатрии. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2007; 4: 90–100.
9. Чугунова О. Л., Сухоруков В. С., Казанцева И. А. и др. Метаболическая коррекция нарушений клеточного энергообмена у детей с задержкой внутриутробного развития в неонатальном периоде. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2008; 2: 13–18.
10. Сухоруков В. С., Виноградова Т. В., Клейменова Н. В. и др. Роль митохондриальной цитопатии в нарушении функций иммунокомпетентных клеток при хронических заболеваниях у детей. *Пособие для врачей*. М.: МЗ РФ, МНИИПДХ, 2004.
11. Семячкина А. Н., Николаева Е. А., Новиков П. В. и др. Нарушения процессов клеточной биоэнергетики у детей с моногенными заболеваниями соединительной ткани (синдромы Марфана и Элерса-Данлоса) и методы их терапевтической коррекции. *Медицинская генетика*. 20026; 4: 186–190.
12. Семячкина А. Н., Сухоруков В. С., Семячкина С. В. и др. Нарушения процессов клеточной биоэнергетики и методы их терапевтической коррекции у детей с моногенными заболеваниями соединительной ткани. IX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», 8–12 апреля 2002 г. М.: Здоровье человека, 2002a: 403.
13. Николаева Е. А., Сухоруков В. С., Семячкина А. Н. и др. Эффективность медикаментозной коррекции недостаточности карнитина у детей с генетически детерминированными заболеваниями соединительной ткани. *Вестн. педиатр. фармаколнутрициол*. 2005; 2 (3): 16–20.
14. Сухоруков В. С., Нарциссов Р. П., Петричук С. В. и др. Сравнительная диагностическая ценность анализа скелетной мышцы и лимфоцитов при митохондриальных болезнях. *Архив патологии*. 2000; 62 (2): 19–21.
15. Нарушение клеточного энергообмена у детей. Ред. В. С. Сухорукова и Е. А. Николаевой. М.: Ates, 2004: 79.

ЦИСТАТИН С — РАННИЙ МАРКЕР ПОРАЖЕНИЯ ПОЧЕК У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ФАБРИ (ПРЕДСТАВЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО НАБЛЮДЕНИЯ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

К.Г. БУСЛОВ, А.П. ХМЫРОВА, В.И. ЛАРИОНОВА
ГБОУ ВПО СПбГПМА Минздравсоцразвития России

Резюме. Болезнь Фабри — редкое наследственное заболевание, относящееся к группе лизосомных болезней накопления (ЛБН), подгруппе (глико)сфинголипидозов. Дефицит фермента α -галактозидазы приводит к накоплению в лизосомах глоботриаозилцерамида (ГЛ-3; GL-3; Gb-3), наиболее активно накопление происходит в эндотелии сосудов и гладкомышечных клетках, нервных клетках, почечных подоцитах, клетках мезангия и канальцев, клетках миокарда и проводящей системы сердца. При болезни Фабри основными причинами смерти являются хроническая почечная недостаточность (ХПН) и поражение сердечно-сосудистой системы, что проявляется клинически ранними инсультами и инфарктами, тяжелыми нарушениями ритма сердца, нередко на фоне гипертрофии миокарда. В настоящее время существует патогенетическое лечение заболевания — фермент-заместительная терапия (ФЗТ) препаратами рекомбинантной человеческой агалзидазы. Каким образом контролировать эффективность проводимой ФЗТ? Как вести мониторинг возможных осложнений заболевания, прежде всего поражения почек и сердечно-сосудистой системы? В качестве эндогенного маркера оценки СКФ в настоящее время доказана практическая значимость определения цистатина С в плазме крови. Повышение уровня цистатина С в плазме крови при болезни Фабри может отражать снижение СКФ на ранних стадиях ХПН и в то же время является маркером неблагоприятного прогноза сердечно-сосудистых осложнений. Нами было выполнено однократное исследование уровня креатинина и цистатина С у пробанда — мужчины 42 лет, страдающего болезнью Фабри, которому с 28 лет проводится гемодиализ. Исследование этих же показателей было выявлено у членов семьи — у его сибса (сестры), а также сына сестры и дочери брата, умершего в возрасте 32 лет от ХПН, которые все являются носителями мутации R301L в гене α -галактозидазы. Дочь брата пробанда, 17 лет, не имеет клинических проявлений. У сестры пробанда отмечаются парестезии с возраста 34–35 лет и единичные ангиокератомы. У сына сестры отмечаются парестезии и болевые кризы с 9 лет; в анамнезе — однократно отмечалась микроальбуминурия.

Наиболее значимые повышения исследованных маркеров выявлены в крови пробанда, нуждающегося в гемодиализе (терапия фермент-замещающим препаратом несвоевременная и в настоящий момент не в требуемом объеме). У других обследованных в представленной семье пациентов уровень цистатина С выше нормы, что свидетельствует о начальном поражении почек и может расцениваться как указание на необходимость начала лечения с помощью ФЗТ.

Ключевые слова: цистатин С, болезнь Фабри, хроническая почечная недостаточность, скорость клубочковой фильтрации.

CYSTATIN C AS EARLY MARKER OF KIDNEYS AFFECTION IN PATIENTS WITH FABRY DISEASE (CLINICAL CASE OBSERVATION AND PUBLICATIONS REVIEW)

K.G. BUSLOW, A.P. CHMIROVA, V.I. LARIONOVA
Federal State Budget Institution of Higher Professional education "Saint-Petersburg State Pediatric
Medical Academy" Ministry of Health and Social Development of Russian Federation

Summary. Fabry disease is a rare hereditary disease from the group of lysosome storage diseases, subgroup of glycol sphingolipidoses. α -galactosidase deficiency leads to accumulation of globotriaosylceramide in lysosomes (GL-3; Gb-3). The most active accumulation takes place in vascular endothelium and smooth muscular cells, nervous cells, renal podocytes, mesangial and tubules cells, cardiomyocytes and conductive system of heart. The causes of death in Fabry disease patients can be chronic kidneys failure and cardiovascular affection. Clinical manifestations of these conditions can be the early strokes and myocardial infarctions, severe rhythm disorders, often accompanied by myocardial hypertrophy. Currently the pathogenetic treatment exists — replacing treatment by recombinant human agalzydase. How to control treatment efficacy? How to monitor possible complications, first of all kidneys and cardiovascular system affection? Plasma level of Cystatin C is now considered as endogenous marker of GFR evaluation. Cystatin C level evaluation in plasma in patients with Fabry disease can reflect the GFR decrease at early stages of chronic renal failure and at the same time can be considered as a marker of unfavorable

prognosis of cardiovascular complications. We performed the evaluation of creatinin and cystatine C in male proband 42 years old, suffering from Fabry disease. Since age 28 this patient was receiving dialysis treatment. The same indicators were evaluated in his sister, son of the sister and daughter of brother. The proband's brother died in age of 32 from chronic renal failure. All these subjects carry the R301L mutation of α -galactosidase gene. Daughter of proband is 17 years old and doesn't have symptoms. Proband's sister has paresthesias since age 34–35 and single angiokeratomas. The son of the sister has paresthesias and pain crises since 9 years old, in anamnesis once microalbuminuria was revealed.

The most significant increase of the above mentioned markers were revealed in proband, receiving dialysis treatment (replace treatment by enzyme was not started in time and currently its amount is not sufficient). In other family members cystatin c level is higher than normal. This points on the initial stage of kidneys affection and can be evaluated as a marker of the necessity of enzyme replacement treatment start.

Key words: *cystatin C, Fabry disease, chronic renal failure, glomerular filtration rate.*

Данные для корреспонденции:

Ларионова Валентина Ильинична — д. м. н., руководитель лаборатории молекулярной диагностики с расширенной группой по экогенетике НИЦ СПбГПМА, 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2, тел.: (812) 542-04-44

Болезнь Фабри (болезнь Андерсона–Фабри, диффузная универсальная ангиокератома туловища; OMIM #301500) — редкое наследственное заболевание, относящееся к группе лизосомных болезней накопления (ЛБН), подгруппе (глико)сфинголипидозов. Лизосомы — специализированные клеточные органеллы, присутствующие во всех клетках организма, — выполняют функцию внутриклеточной деградации крупных макромолекул. Для всех ЛБН характерно прогрессирующее течение, поражение всех клеток, тканей, органов и систем. При болезни Фабри наблюдается прогрессирующее течение с варьирующим возрастом манифестации (5–30 лет). Дефицит фермента α -галактозидазы приводит к накоплению в лизосомах глоботриаозилцерамида (ГЛ-3; GL-3; Gb-3) [1–2]. Наиболее активно накопление ГЛ-3 происходит в эндотелии сосудов и гладкомышечных клетках, нервных клетках, почечных подоцитах, клетках мезангия и канальцев, клетках миокарда и проводящей системы сердца [3]. Первые симптомы заболевания могут наблюдаться уже в подростковом возрасте, но обычно не рассматриваются специалистами в контексте болезни Фабри. В значительной мере это обусловлено полиморфностью клинических проявлений и неспецифичностью симптомов. Среди ранних симптомов отмечаются такие как акропарестезия, болевые кризы (т. н. «кризы Фабри»), провоцируемые резкой сменой температуры окружающей среды, лихорадка неясного генеза, гипогидроз или ангидроз, общая слабость, непереносимость физической нагрузки, жалобы со стороны кишечника (по типу «синдрома раздраженной кишки»), боль в животе, тошнота [4]. Перечисленные симптомы могут наблюдаться в разном сочетании, с разной степенью выраженности и манифестировать в разном возрасте. Поздние осложнения сопряжены с непосредственной угрозой жизни пациента. При болезни Фабри основными причинами смерти являются хроническая почечная недостаточность (ХПН) и поражение сердечно-сосудистой системы, что проявляется клинически ранними инсультами и инфарктами, тяжелыми нарушениями

ритма сердца (НРС), нередко на фоне гипертрофии миокарда [4–7]. В достаточной степени патогномичными для болезни Фабри являются ангиокератомы — мелкие безболезненные, не зудящие, возвышающиеся над кожей высыпания, цвет которых может варьировать от розовых до темно-вишневых. Ангиокератомы не исчезают со временем, рефрактерны к лечению. Типичная локализация — на бедрах, в нижней части живота и паху, на ягодицах («зона бикини») [8]. Другой характерный для заболевания признак — спицеобразное или «пропеллерообразное» помутнение роговицы, выявляемое при осмотре с помощью щелевой лампы [9–10]. Признано, что распространенность заболевания составляет 1 : 40 000 лиц мужского пола. Однако по результатам скринингового исследования в США и Европе частота составила 1 : 3000 новорожденных мальчиков [11]. Это исследование позволяет по-новому расценивать как эпидемиологию самой болезни Фабри, так и ее клинических осложнений — прежде всего заболеваний сердечно-сосудистой системы и ХПН, в первую очередь у мужчин до 50 лет. Ген α -галактозидазы локализуется на X-хромосоме, и наследование X-сцепленное. Тем не менее, более чем у 60% женщин — носителей мутации могут выявляться клинические проявления болезни Фабри различной степени выраженности [12]. Лабораторная диагностика болезни Фабри основывается на обнаружении повышенной концентрации ГЛ-3 в плазме крови и моче, а также определении активности фермента α -D-галактозидазы в лейкоцитах крови или культуре фибробластов кожи (<5% при классической форме; ↓ до 5–35% при атипичной форме) [13]. Следует отметить, что у женщин (гетерозиготные носители мутантного гена) диагностика на основе определения биомаркера (ГЛ-3), как и исследование активности фермента, в значительном проценте случаев могут быть ложно-отрицательными при значительном поражении органов-мишеней [14–16]. В таких случаях диагноз может быть установлен только при молекулярно-генетическом исследовании — полном прочтении (секвенировании) нуклеотидной последова-

тельности гена. В настоящее время существует патогенетическое лечение заболевания — фермент-заместительная терапия (ФЗТ) препаратами рекомбинантной человеческой агалактидазы. Эффективность терапии в значительной мере определяется сроками начала проведения терапии от момента манифестации заболевания. Болезнь Фабри, как и все ЛБН, характеризуется неуклонно прогрессирующим течением, и «повернуть» патологический процесс вспять в случаях далеко зашедших осложнений практически невозможно. Ранняя диагностика и своевременное лечение крайне важны.

Когда необходимо начинать лечение? Каким образом контролировать эффективность проводимой ФЗТ? Как вести мониторинг возможных осложнений заболевания, прежде всего поражения почек и сердечно-сосудистой системы? Немаловажная роль в ответах на эти вопросы отводится лабораторным методам исследования.

Для оценки функции почек используется определение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) посредством измерения клиренса экзогенных маркеров клубочковой фильтрации («золотой стандарт») или с помощью расчетов, основанных на измерении значений уровня эндогенных маркеров: креатинина и цистатина С. При этом, как маркер СКФ, креатинин имеет следующие ограничения: 1) уровень креатинина варьирует в зависимости от возраста, пола, этнической принадлежности, отношения мышечной массы к общему весу, принимаемых медикаментов, диеты; 2) концентрация креатинина может не изменяться в случаях, когда большая часть почечной ткани уже не функционирует (СКФ < 40–70 мл/мин/1,73); 3) при ухудшении клубочковой фильтрации происходит компенсаторное усиление канальцевой секреции креатинина, в результате чего происходит завышенная оценка функции почек; 4) креатинин недостаточно точно отражает реальную картину при острых изменениях функции почек до тех пор, пока не достигается некоторая стабилизация состояния, что чаще всего происходит спустя два-три дня после инициации поражения [17]. В качестве эндогенного маркера оценки СКФ в настоящее время доказана практическая значимость определения цистатина С в плазме крови. Цистатин С (CysC) — маленький белок, состоящий из 120 аминокислотных остатков (молекулярная масса 13,26 kD). Цистатин С синтезируется всеми клетками организма с постоянной скоростью и также с постоянной скоростью элиминируется почками [18]. Следовательно, концентрация цистатина С в плазме крови практически постоянна. Она не зависит от таких параметров как возраст (у детей старше 1 года), пол, этническая принадлежность, диета, мышечная масса. Уровень цистатина С подвержен меньшей

межиндивидуальной вариабельности по сравнению с креатинином [19–20]. Цистатин С — предпочтительный эндогенный маркер для подбора дозировок фармпрепаратов, элиминируемых почками [21]. Возможно использование цистатина С у пациентов с хроническими заболеваниями печени, в отличие от креатинина [22]. Уровень цистатина С не изменяется на фоне воспалительных процессов, в том числе в самих почках, объективно отражая СКФ [22–23]. Цистатин С не секретируется в почечных канальцах, что позволяет рассматривать его как чувствительный маркер ранней ХПН. Цистатин С может использоваться при начальных стадиях ХПН, в диапазонах снижения СКФ < 40–70 мл/мин/1,73, что ниже порога чувствительности для креатинина. Цистатин С может использоваться как чувствительный маркер оценки СКФ при острой почечной недостаточности [17–19]. Повышение уровня цистатина С в плазме крови при болезни Фабри может отражать снижение СКФ на ранних стадиях ХПН и в то же время является маркером неблагоприятного прогноза сердечно-сосудистых осложнений [19, 24–27]. Это особенно важно ввиду того, что при болезни Фабри основными причинами смерти являются ХПН и поражение сердечно-сосудистой системы. Однако следует учитывать, что на уровень цистатина С влияет дисфункция щитовидной железы: в ряде клинических исследований отмечалась обратная зависимость между уровнем цистатина и тиреоидных гормонов. Кроме того, до конца не выяснено влияние высокодозной гормонотерапии на уровень цистатина С у пациентов с ХПН, при том что у пациентов без ХПН глюкокортикостероиды не оказывали влияния на концентрацию цистатина С [28–30].

Нами было выполнено однократное исследование уровня креатинина и цистатина С у четверых пациентов с болезнью Фабри из одной семьи, которые являются носителями мутации R301L в гене α -галактозидазы (рис. 1). Пробанд, мужчина 42 лет, которому с 28 лет проводится гемодиализ, его сестра и сын сестры, а также дочь брата, умершего в возрасте 32 лет от ХПН. Мать

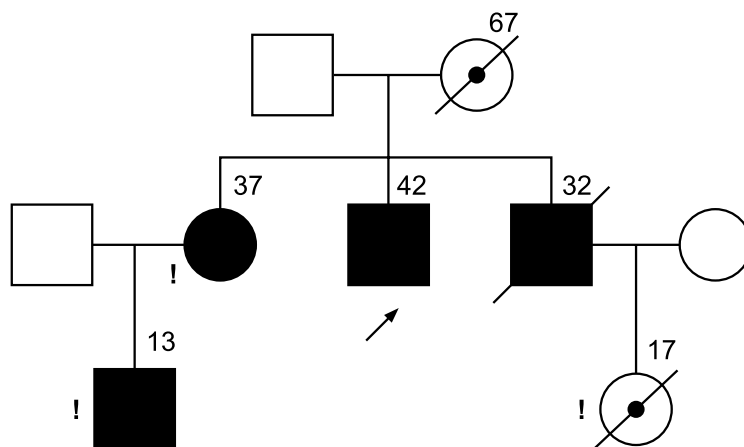


Рис. 1. Генеалогическая схема семьи, отягощенной болезнью Фабри; мутация R301L в гене α -галактозидазы

пробанда умерла от инсульта в возрасте 67 лет. Учитывая ее возраст, невозможно однозначно расценивать инсульт как осложнение болезни Фабри. Отец пробанда в возрасте старше 70 лет не имеет клинических проявлений болезни Фабри и не является носителем мутации. Дочь брата пробанда, 17 лет, не имеет клинических проявлений. У сестры пробанда отмечаются парестезии с возраста 34–35 лет и единичные ангиокератомы. У сына сестры отмечаются парестезии и болевые кризы с 9 лет; в анамнезе — однократно отмечалась микроальбуминурия. Никто из пациентов не получал ФЗТ в требуемом объеме.

Результаты исследования уровня креатинина и цистатина С представлены в таблице 1.

Наиболее значимые повышения исследованных маркеров выявлены в крови пробанда, нуждающегося в гемодиализе. У других обследованных в представленной семье пациентов уровень цистатина С выше нормы, что свидетельствует о начальном поражении почек. При этом у сестры пробанда уровень креатинина на верхней границе нормы. У дочери умершего брата пробанда определить сывороточный креатинин не удалось. Поскольку в представленной семье ведущим угрожающим осложнением является поражение почек, то выявление ранних признаков снижения СКФ может расцениваться как указание на необходимость начала лечения с помощью ФЗТ.

Какова динамика уровня цистатина С при болезни Фабри на фоне проводимой ФЗТ? К настоящему времени данных, позволяющих ответить на этот вопрос, нет. Однако в оценке СКФ на основании исследования креатинина были отмечены улучшения уже после 6–12 мес. ФЗТ у пациентов с ХПН 1 и 2 стадий. У пациентов с ХПН 3 стадии отмечалось замедление прогрессирования в течение 4 лет наблюдения, в сравнении с пациентами без ФЗТ [31–33].

В заключение следует отметить, что цистатин С не является специфичным биологическим маркером болезни Фабри. Однако повышение концентрации цистатина С в крови позволяет на ранних этапах выявить поражения почек и сердечно-сосудистой системы у пациентов с болезнью Фабри.

Литература

1. Hozumi I., Nishizawa M., Ariga T., Miyatake T. Biochemical and clinical analysis of accumulated glycolipids in symptomatic heterozygotes of angiokeratoma corporis diffusum (Fabry's disease) in comparison with hemizygotes. *J. Lipid. Res.* 1990, Feb; 31 (2): 335–340.
2. Aerts J. M., Groener J. E., Kuiper S. et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008 Feb 26; 105(8): 2812–2807. Epub 2008 Feb 19.
3. Clarke J. T. Narrative review: Fabry disease. *Ann. Intern. Med.* 2007, Mar 20; 146 (6): 425–433.
4. Mehta A., Widmer U. Natural history of Fabry disease. In: Mehta A., Beck M., Sunder-Plassmann G., editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS.* Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006. Chapter 19.
5. Sims K., Politei J., Banikazemi M., Lee P. Stroke in Fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: natural history data from the Fabry Registry. *Stroke.* 2009, Mar; 40 (3): 788–794. Epub 2009, Jan 15.
6. Ortiz A., Cianciaruso B., Cizmarik M. et al. End-stage renal disease in patients with Fabry disease: natural history data from the Fabry Registry. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010, Mar; 25 (3): 769–775. Epub 2009 Oct 21.
7. Barbey F., Brakch N., Linhart A. et al. Cardiac and vascular hypertrophy in Fabry disease: evidence for a new mechanism independent of blood pressure and glycosphingolipid deposition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, Apr; 26 (4): 839–844. Epub 2006 Feb 9.
8. Lidove O., Jaussaud R., Aractingi S. Dermatological and soft-tissue manifestations of Fabry disease: characteristics and response to enzyme replacement therapy. In: Mehta A., Beck M., Sunder-Plassmann G., editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS.* Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006. Chapter 24.
9. Sher N. A., Letson R. D., Desnick R. J. The ocular manifestations in Fabry's disease. *Arch. Ophthalmol.* 1979, Apr; 97 (4): 671–676.
10. Sodi A., Ioannidis A., Pitz S. Ophthalmological manifestations of Fabry disease. In: Mehta A., Beck M., Sunder-Plassmann G., editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS.* Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006. Chapter 26.
11. Spada M., Pagliardini S., Yasuda M. et al. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am. J. Hum. Genet.* 2006, Jul; 79 (1): 31–40. Epub 2006, Apr 28.
12. Wilcox W. R., Oliveira J. P., Hopkin R. J. et al. Fabry Registry. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. *Mol. Genet. Metab.* 2008 Feb; 93 (2): 112–128. Epub 2007 Nov 26.
13. Краснопольская К. Д. Наследственные болезни обмена веществ. Справочное пособие для врачей. М., 2005: 57.

Таблица 1. Уровень креатинина и цистатина С у пациентов в семье, отягощенной болезнью Фабри; мутация R301L в гене α -галактозидазы

Сибсы	Пол	Возраст	Клинические проявления	Креатинин сыворотки, мкмоль/л	Цистатин С, мг/л
Пробанд	Муж	42	Выражены	721 (п до 106)	9,3 (п до 0,93)
Сестра	Жен	37	Есть	80 (п до 80)	0,96 (п до 0,93)
Сын сестры	Муж	13	Есть	76 (п до 70)	1,14 (п до 0,93)
Дочь брата	Жен	17	Нет	N/D	1,04 (п до 0,93)

14. Gupta S., Ries M., Kotsopoulos S., Schiffmann R. The relationship of vascular glycolipid storage to clinical manifestations of Fabry disease: a cross-sectional study of a large cohort of clinically affected heterozygous women. *Medicine (Baltimore)*. 2005, Sep; 84 (5): 261–268.
15. Winchester B., Young E. Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease. In: Mehta A., Beck M., Sunder-Plassmann G., editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006. Chapter 18.
16. Linthorst G. E., Poorthuis B. J., Hollak C. E. Enzyme activity for determination of presence of Fabry disease in women results in 40% false-negative results. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008, May 27; 51 (21): 2082; author reply 2082–2083.
17. Roberts D. M., Wilks M. F., Roberts M. S. et al. Changes in the concentrations of creatinine, cystatin C and NGAL in patients with acute paraquat self-poisoning. *Toxicol. Lett.* 2011, Apr 10; 202 (1): 69–74. Epub 2011, Feb 1.
18. Pucci L., Triscornia S., Lucchesi D. et al. Cystatin C and estimates of renal function: searching for a better measure of kidney function in diabetic patients. *Clin. Chem.* 2007, Mar; 53 (3): 480–488. Epub 2007, Jan 26.
19. Stevens L. A., Coresh J., Schmid C. H. et al. Estimating GFR using serum cystatin C alone and in combination with serum creatinine: a pooled analysis of 3,418 individuals with CKD. *Am. J. Kidney Dis.* 2008, Mar; 51 (3): 395–406.
20. Ristiniemi N., Savage C., Bruun L. et al. Evaluation of a new immunoassay for cystatin C, based on a double monoclonal principle, in men with normal and impaired renal function. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011, Jun 15. [Epub ahead of print]
21. Modig S., Lannering C., Ostgren C. J., Mölstad S., Midlov P. The assessment of renal function in relation to the use of drugs in elderly in nursing homes; a cohort study. *BMC Geriatr.* 2011, Jan 11; 11: 1.
22. Orlando R., Mussap M., Plebani M. et al. Diagnostic value of plasma cystatin C as a glomerular filtration marker in decompensated liver cirrhosis. *Clin. Chem.* 2002, Jun; 48 (6 Pt 1): 850–858.
23. Grubb A., Bjork J., Nyman U. et al. Cystatin C, a marker for successful aging and glomerular filtration rate, is not influenced by inflammation. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2011, Apr; 71 (2): 145–149. Epub 2011 Jan 4.
24. Ordu S. The prognostic importance of cystatin C in severe systolic dysfunction without chronic kidney disease. *Ann. Saudi. Med.* 2010 Nov-Dec; 30 (6): 495–496.
25. Urbonaviciene G., Shi G. P., Urbonavicius S. et al. Higher cystatin C level predicts long-term mortality in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*. 2011, Jun; 216 (2): 440–445. Epub 2011 Feb 18.
26. Lee M., Saver J. L., Huang W. H., Chow J., Chang K. H., Ovbiagele B. Impact of elevated cystatin C level on cardiovascular disease risk in predominantly high cardiovascular risk populations: a meta-analysis. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes*. 2010 Nov; 3 (6): 675–683. Epub 2010 Oct 5.
27. Kiyosue A., Hirata Y., Ando J. et al. Plasma cystatin C concentration reflects the severity of coronary artery disease in patients without chronic kidney disease. *Circ. J.* 2010, Nov; 74 (11): 2441–2447. Epub 2010 Sep 29.
28. Wiesli P., Schwegler B., Spinaz G. A., Schmid C. Serum cystatin C is sensitive to small changes in thyroid function. *Clin. Chim. Acta*. 2003, Dec; 338 (1–2): 87–90.
29. Bokenkamp A., van Wijk J. A., Lentze M. J. et al. Effect of corticosteroid therapy on serum cystatin C and beta2-microglobulin concentrations. *Clin. Chem.* 2002, Jul; 48 (7): 1123–1126.
30. Ozden T. A., Tekerek H., Bas F., Darendeliler F. Effect Of Hypo- and Euthyroid Status On Serum Cystatin C Levels. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 2010, Dec; 2 (4): 155–158. Epub 2010, Nov 4.
31. Schwarting A., Sunder-Plassmann G., Mehta A., Beck M. Effect of enzyme replacement therapy with agalsidase alfa on renal function in patients with Fabry disease: data from FOS — the Fabry Outcome Survey. In: Mehta A., Beck M., Sunder-Plassmann G., editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006. Chapter 38.
32. Dehout F., Schwarting A., Beck M. et al. FOS Investigators. Effects of enzyme replacement therapy with agalsidase alfa on glomerular filtration rate in patients with Fabry disease: preliminary data. *Acta Paediatr. Suppl.* 2003, Dec; 92 (443): 14–15; discussion 5.
33. Branton M., Schiffmann R., Kopp J. B. Natural history and treatment of renal involvement in Fabry disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, Jun; 13. Suppl 2: 139–143.

АКТУАЛЬНОСТЬ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ. ЧАСТЬ I: СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ (КЛАССИФИКАЦИЯ, ОБРАЗОВАНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА)

А.В. СЕМЕНОВ

Московский НИИ педиатрии и детской хирургии

***Резюме.** Обзор отечественной и зарубежной литературы посвящен актуальности применения хемилюминесцентного анализа в медицине. Несмотря на то, что метод давно используется в исследовательских целях в фундаментальных науках, ввиду сложности регистрации интенсивности свечения этот метод только сейчас начинает широко внедряться в практическую медицину, а благодаря возможности компьютерной обработки результатов сотрудник получает очень ценную информацию при определении уровня свободных радикалов, играющих не только негативную роль в ряде патологических состояний, но и необходимых в физиологических реакциях организма. Хемилюминесценция – один из немногочисленных методов исследования, позволяющих выявить и оценить уровень активности в организме свободных радикалов, имеющих как колоссальную отрицательную роль (давно известную и доказанную) (патология нервной системы, кардиопатология и др.), так и положительную (физиологическую, выявленную недавно и активно изучаемую) (киллинговая функция фагоцитоза, перекисное окисление липидов и др.). В статье приводится классификация свободных радикалов (первичные, вторичные, третичные), источники их выработки, дается подробная их характеристика, физиологическая и патологическая роль отдельных радикалов, а также затрагиваются вопросы метаболизма свободных радикалов в организме. Отдельно обсуждаются вопросы защиты клеток и организма от избытка свободных радикалов, описаны системы контроля уровня свободных радикалов в организме.*

***Ключевые слова:** хемилюминесценция, свободные радикалы, классификация, продукция, характеристика, контроль.*

ACTUALIZATION OF CHEMILUMINESCENT METHOD OF STUDY IN MEDICINE. PART I: FREE RADICALS (CLASSIFICATION, PRODUCTION AND DESCRIPTION)

A.V. SEMENOV

Moscow scientific research institute of Pediatrics and Pediatric Surgery

***Summary.** Review of Russian and foreign publications devoted to the use of chemiluminescence analysis in medicine. This method is widely used in scientific purposes in fundamental sciences, but its application to practical medicine started only recently because of the difficulties of luminescence intensity registration. Computer analysis of the results can give the important information concerning the levels of free radicals. These particles play not only negative role in pathogenesis of different conditions but are also necessary in different physiological reactions. Chemoluminescence is one of the methods which give possibility to evaluate the activity of free radicals which play the pathogenetic role in the diseases of nervous and cardiovascular systems as well as are important in some physiological processes (killing function of phagocytes, lipids peroxidation etc). The article discusses classification of free radicals (primary, secondary, tertiary), their sources and detailed description as well as physiological and pathological role of some substances. The problems of free radicals metabolism are also discussed. Separately the questions concerning the cellular antioxidant defense and systems of free radicals level control are described.*

***Key words:** chemiluminescence, free radicals, classification, production, description, control.*

Данные для корреспонденции:

Семенов Алексей Владимирович – с. н. с. НИЛ общей патологии
ФГБУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии» Минздравсоцразвития РФ,
125412, Москва, Талдомская, 2,
тел. (499) 487 76 00, e-mail: asem43@mail.ru

Введение

Как известно, традиционно объектами биологической химии являются несколько классов органических соединений, выполняющих в клетке жизненно важные функции — структурную (белки и липиды), энергетическую (липиды и углеводы), регуляторную (ферменты, то есть опять же белки), сигнальную (гормоны) и информационную (нуклеиновые кислоты, то есть ДНК и РНК), а также множество более просто устроенных метаболитов (то есть продуктов распада или, наоборот, «сырья» для синтеза все тех же белков, жиров и углеводов). Из неорганических соединений жизненно важными всегда представлялись в первую очередь вода (как универсальный растворитель) и кислород. Именно с последним оказалось связанным одно из наиболее интересных и значимых направлений современной биохимии — проблема свободных радикалов и активных форм кислорода [1].

Живой организм представляет собой сложнейшую систему, состоящую из огромного количества клеток (организм человека содержит несколько сот триллионов клеток), являющихся, в свою очередь, сложнейшими образованиями. В каждую секунду в организме происходят сотни разнообразных химических реакций, самостоятельных и объединенных в процессы. Эти химические реакции и процессы составляют основу жизнедеятельности живого организма. И вся эта сложнейшая система работает четко и слаженно, быстро и точно в соответствии с потребностями реагирует изменениями обмена веществ на внешние воздействия, сдвиги во внутренней среде.

Энергично протекающие химические реакции сопровождаются, как правило, выделением энергии в фор-

ме тепла; существуют, однако, такие реакции, которые сопровождаются излучением света.

Свечение, сопровождающее химические реакции, называется хемилюминесценцией. Хемилюминесцентная реакция включает следующие основные стадии: а) восстановление одного из участников реакции и окисление второго, приводящее к накоплению химической энергии в системе; б) перенос электрона на один из более высоких энергетических уровней и образование, таким образом, продукта реакции в электронно-возбужденном состоянии; в) высвечивание фотона при переходе молекулы из электронно-возбужденного в основное состояние (люминесценция) [2, 3].

Хемилюминесценция — один из немногочисленных методов исследования, позволяющих выявить и оценить уровень активности в организме свободных радикалов, имеющих как колоссальную отрицательную роль (давно известную и доказанную), так и положительную (физиологическую, выявленную недавно и активно изучаемую). Именно с определения интенсивности свободно-радикальных процессов хемилюминесценция и «вошла» в клиническую практику.

Группы атомов и молекул, которые по тем или иным причинам не окислились или не восстановились до конца, — вещества, состоящие из особых групп атомов или молекул, имеют очень высокую реакционную способность, так как содержат неспаренные (непрореагировавшие) электроны на внешних электронных уровнях, — получили название «свободные радикалы». Как известно, характерной особенностью свободных радикалов является наличие на высшей энергетической орбитали неспаренного электрона, что придает им высокую реакци-

Таблица 1. Экзо- и эндогенные факторы, способствующие образованию свободных радикалов [10]

Эндогенные	Экзогенные
Гипоксия	Табачный дым
Воспаление	Чрезмерная физическая нагрузка
Канцерогенез	Загрязнение воздуха выбросами транспорта и промышленных предприятий
Гестозы беременных	Радиационное излучение
В процессе переноса электронов в митохондриальной дыхательной цепи	Ультрафиолетовое излучение
В реакциях, которые катализируются оксидазами (образуется перекись водорода), в том числе в свободнорадикальных процессах, совершающихся в фагоцитах	Ксенобиотики, в том числе лекарства, анестетики, пестициды, промышленные растворители
В реакциях микросомального окисления при обезвреживании веществ с участием цитохрома Р-450	Стресс, переутомление
В реакциях самопроизвольного (неферментативного) окисления веществ (гемоглобина, ферредоксинов, адреналина и др.)	Озон
В биологических системах с наличием ионов металлов с переменной валентностью и, прежде всего, железа (свободных атомов, так называемых внегемовых)	Компоненты пищи (некачественный, окисленный жир, избыток полиненасыщенных жирных кислот, железа, витамина D)

онную способность к участию во многих биохимических реакциях [3].

Свободнорадикальное окисление является одним из универсальных механизмов повреждения клеток, но вместе с тем это и необходимый для нормального функционирования клеток процесс. Свободнорадикальные процессы участвуют в реакциях окислительного фосфорилирования, биосинтеза простагландинов и нуклеиновых кислот, в регуляции липолитической активности, в процессах митоза, метаболизма катехоламинов. В то же время интенсификация свободнорадикального окисления является закономерным процессом потенцирования патогенных эффектов воздействия этиологических факторов инфекционной и неинфекционной природы. К настоящему моменту довольно четко определено происхождение свободных радикалов в биологических системах и дана оценка их метаболической значимости при различных заболеваниях, в том числе и инфекционной природы [4–10].

Физиологическое изнашивание организма, болезни, старение — главные последствия свободнорадикальных реакций. Неудивительно, что эволюция «вооружила» клетку целым рядом механизмов антирадикальной защиты, о которой мы поговорим в отдельной статье.

В день каждая клетка нашего организма образует миллиарды радикальных соединений — они являются побочным продуктом обмена веществ. Эти активные молекулы готовы взаимодействовать с любым, кто способен приобретать или отдавать электроны. Цепляясь к другим молекулам, они повреждают клеточные мембраны, разрушают клетки, изменяют структуру ДНК.

Однако свободные радикалы наносят не только вред. Это стало известно только в последние годы. Об этом будет написано ниже.

Классификация радикалов

Все радикалы, образующиеся в нашем организме, можно разделить на природные и чужеродные. В свою очередь природные радикалы можно разделить на первичные, вторичные и третичные (см. рис. 1).

Первичными можно назвать *радикалы*, образование которых осуществляется при участии определенных ферментных систем. Прежде всего, к ним относятся ра-

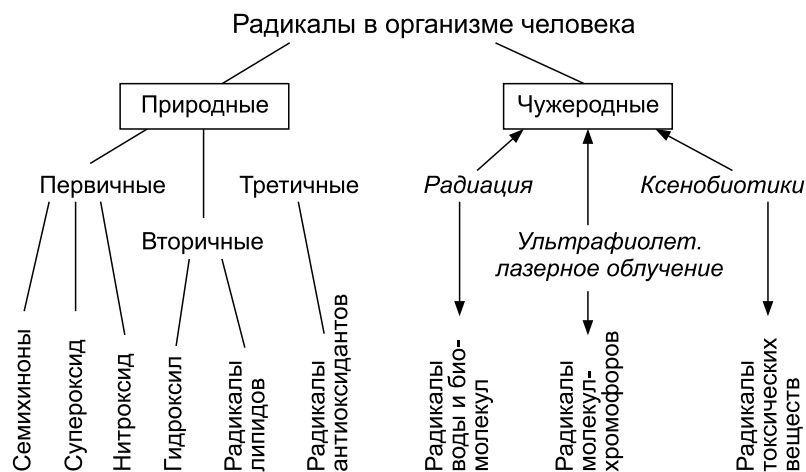


Рис. 1. Классификация свободных радикалов (Владимиров Ю.А., 2000) [10]

дикалы (семихиноны), образующиеся в реакциях таких переносчиков электронов, как коэнзим Q и флавопротеины. Два других радикала — супероксид ($\cdot\text{OO}\cdot$) и монооксид азота ($\cdot\text{NO}$) (см. табл. 2).

Вторичные радикалы, в отличие от первичных, образуются в неферментативных реакциях и, насколько известно в настоящее время, не выполняют физиологически полезных функций. Напротив, они обладают разрушительным действием на клеточные структуры и с полным основанием могут быть названы вредными радикалами. Именно образование вторичных радикалов (а не радикалов вообще) приводит к развитию патологических состояний и лежит в основе канцерогенеза, атеросклероза, хронических воспалений и нервных дегенеративных болезней (см. табл. 4) [8, 10, 11].

Забегая несколько вперед, дадим определение активных форм, молекул, которые служат источником вторичных радикалов.

Активные формы. Из первичного радикала супероксида, а также в результате других реакций в организме образуются весьма активные молекулярные соединения: перекись водорода, гипохлорит и гидроперекиси липидов. Такие молекулы, наряду с радикалами, получили в англоязычной литературе название «reactive species», что в русской литературе чаще всего переводится как «активные формы». Чтобы провести водораздел между радикалами и молекулярными продуктами, мы предлагаем называть последние «реактивными мо-

Таблица 2. Первичные радикалы, образующиеся в организме

Название радикала	Структура радикала	Ферментная система, ответственная за образование радикала	Биологическая роль радикала
Супероксид	$\cdot\text{OO}\cdot$	НАДФН-оксидаза	Антимикробная защита
Нитроксид	$\cdot\text{NO}$	NO-синтаза	Фактор расслабления сосудов
Убихинол	$\cdot\text{Q}$	Дыхательная цепь митохондрий	Переносчик электронов

лекулами». Таким образом, предлагается такая терминология:

Активные формы = свободные радикалы +
+ реактивные молекулы

Среди активных форм есть и радикалы, например, гидроксильный радикал ·OH, и молекулы — перекись водорода H₂O₂, хлорноватистая кислота HClO (ее анион ClO⁻ называется гипохлоритом) (см. рис. 1, табл. 3). [10, 11].

Таблица 3. Активные формы молекул, образующиеся в организме

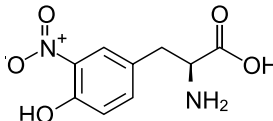
Активные формы кислорода	
HOON	Пероксид водорода
¹ O ₂	Синглетный кислород
HO ₂ ⁰	Гидропероксидный радикал
Активные формы липидов	
LOON	Липогидропероксид
Активные формы азота	
NO	Нитроксид
ONOO ⁻	Пероксинитрит
	Нитротирозин
Активные формы хлора	
ClO ⁻ -	Гипохлорид хлора

Таблица 4. Вторичные радикалы, образующиеся в организме

Название радикала	Структура радикала	Образуется в реакции
Радикал гидроксила	·OH	Fe ²⁺ + HOON ⇒ Fe ³⁺ + HO ⁻ + ·OH Fe ²⁺ + ClO ⁻ + H ⁺ ⇒ Fe ³⁺ + Cl ⁻ + ·OH
Липидные радикалы	LO· L· LOO·	Fe ²⁺ + LOON ⇒ Fe ³⁺ + HO ⁻ + LO· LO· + LH ⇒ LOH + L· L· + O ₂ ⇒ LOO·

Основные источники образования первичных радикалов в организме [10–14]:

Нитроксид:

- эндотелий кровеносных сосудов;
- клетки нервной ткани (нейроны);

- макрофаги — клетки соединительной ткани, обладающие высокой фагоцитарной активностью.

Радикалы кислорода:

- в процессе переноса электронов в митохондриальной дыхательной цепи;
- при гипоксии (в митохондриях нарушается работа цитохромоксидазы, происходит утечка радикала кислорода);
- в реакциях, которые катализируются оксидазами, в том числе в свободнорадикальных процессах, совершающихся в фагоцитах;
- в реакциях микросомального окисления при обезвреживании веществ с участием цитохрома P-450, локализованных в эндоплазматической сети;
- нарушение работы ферментов метаболизма арахидоновой кислоты (липооксигеназа и циклооксигеназа), ксантиноксидазы.

Убихинол:

- Дыхательная цепь митохондрий.

Для понимания образования свободных радикалов кислорода коротко напомним организацию дыхательной цепи митохондрий — основного источника поступления радикалов.

Организация дыхательной цепи в митохондриях

Основные переносчики электронов встроены во внутреннюю мембрану митохондрий и организованы в 4 комплекса, расположенных в определенной последовательности (векторно). В этой последовательности их стандартные окислительно-восстановительные потенциалы становятся более положительными по мере приближения к кислороду. Каждое звено этой цепи специфично в отношении донора и акцептора электронов (митохондриальное окисление).

На первом этапе дегидрогеназы катализируют отщепление водорода от различных субстратов. Если субстратами служат α-гидрокси-малат, изоцитрат, 3-гидроксипутират, водород переносится на NAD⁺. Образовавшийся NADH в дыхательной цепи, в свою очередь, окисляется NADH-дегидрогеназой (комплекс I) [10].

Если субстратом служат такие соединения, как сукцинат или глицерол-3-фосфат, акцептором водорода служат FAD-зависимые дегидрогеназы. От NADH₂ и FADH₂ электроны и протоны передаются на убихинон и далее через цепь цитохромов к молекулярному кислороду (см. рис. 2).

Нарушение работы митохондрий выражается, в частности, в образовании первичных радикалов. При изменении условий функционирования дыхательной цепи (например, при гипоксии) в ней также возможно одноэлектронное восстановление кислорода, объясняющееся тем, что его сродство к убихинону выше, чем к цитохромоксидазе.

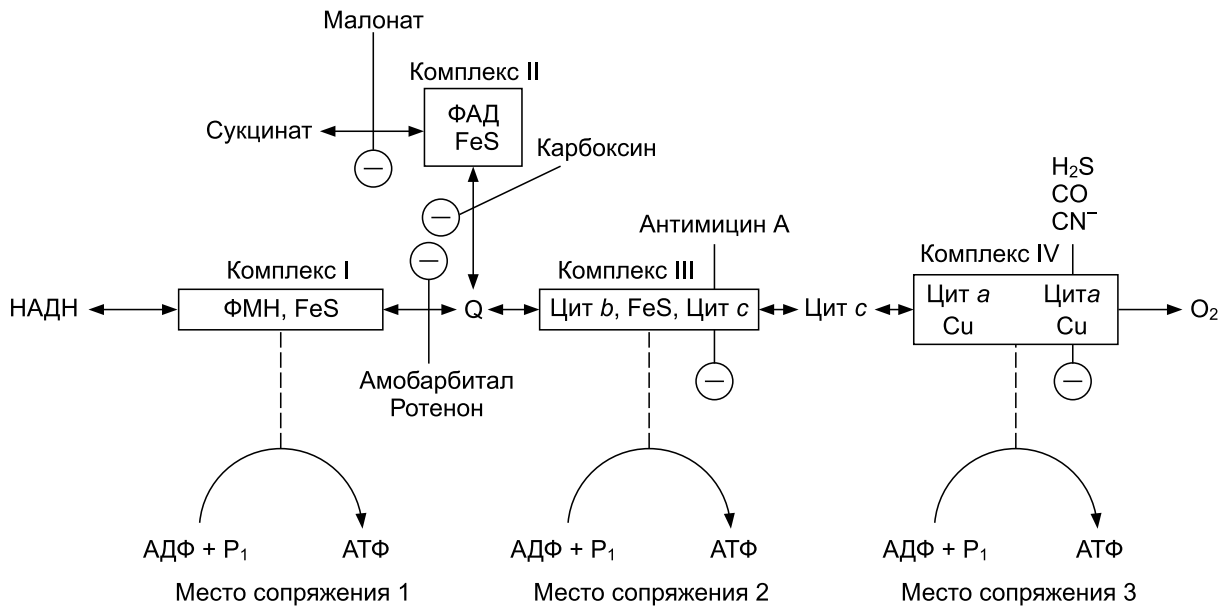


Рис. 2. Схема комплексов дыхательной цепи митохондрий [10]

Внемитохондриальное окисление

На его долю приходится 5–10% кислорода, поступающего в организм. Существуют 2 типа внемитохондриального окисления:

Окисление оксидазного типа

Ферменты — оксидазы. По строению являются металлофлавопротеинами. Содержат металлы с переменной валентностью — железо (Fe), медь (Cu), молибден (Mo). Находятся оксидазы в пероксиосомах — особых образованиях эндоплазматического ретикулума, а также на наружной мембране митохондрий. Отнимают водород от субстрата и передают его на кислород с образованием H₂O₂ — перекиси водорода. Оксидаз в клетке немного, и субстратов для них тоже мало. Эти ферменты обычно обладают широкой субстратной специфичностью и невысокой активностью.

На внешней мембране митохондрий существует дополнительный источник активных форм кислорода, не связанный с дыхательной цепью. Им является моноаминоксидазная система, ответственная за метаболизм биогенных аминов. Катализируя реакцию окислительного дезаминирования, эта система способствует образованию высокорекреационных соединений: альдегидов, аммиака и перекиси водорода, что приводит к инициации окислительного стресса в тканях [15].

Еще одним важным источником свободнорадикальных соединений являются биогенные амины — нейромедиаторы (дофамин, серотонин). При нарушении целостности клеточной мембраны нейромедиаторы высвобождаются и самопроизвольно окисляются; они взаимодействуют с кислородом с образованием супероксид-аниона, перекиси водорода и хинонов/семихинонов, которые могут окислять глутатион и SH-группы белков.

Типичным примером является дофамин, нарушение обмена которого является причиной таких нейродегенеративных процессов, как болезнь Паркинсона [16].

Далее мы дадим краткую характеристику радикалов, веществ, которые вызывают большое количество патогенных состояний и в то же время необходимы в определенных концентрациях для жизнедеятельности клетки. Много образует клетка радикалов или мало — вот одна из первейших задач хемилюминесценции клеток.

Первичные радикалы

1. Оксид азота

Оксид азота образуется в результате окисления аминокислоты аргинина с одновременным синтезом другой аминокислоты — цитруллина под влиянием фермента NO-синтазы.

Синтезировать и выделять NO способно большинство клеток организма человека и животных, однако наиболее изучены три клеточные популяции: эндотелий кровеносных сосудов, клетки нервной ткани (нейроны) и макрофаги — клетки соединительной ткани, обладающие высокой фагоцитарной активностью [17, 18].

В связи с этим традиционно выделяют три основные изоформы NO-синтаз: нейрональную, макрофагальную и эндотелиальную (обозначаются соответственно как NO-синтаза I, II и III). Нейрональная и эндотелиальная изоформы фермента постоянно присутствуют в клетках и называются конститутивными, а вторая изоформа (макрофагальная) является индуцибельной — фермент синтезируется в ответ на определенное внешнее воздействие на клетку [19].

Активность конститутивных изоформ фермента прямо зависит от внутриклеточной концентрации ионов кальция или кальмодулина и, таким образом, повыша-

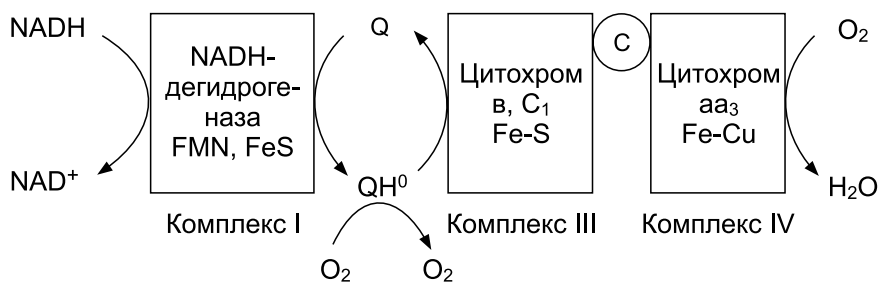


Рис. 3. Образование супероксида в цепи переноса электронов митохондрий [21]. Комплекс II на рисунке не указан

ется под влиянием различных агентов, приводящих к увеличению их уровня в клетке. Конститутивные изоформы NO-синтазы имеют преимущественно физиологическое значение, поскольку количество образуемого NO относительно невелико.

Индукцибельные изоформы NO-синтазы проявляют активность через некоторое время (как правило, 6–8 ч — время, необходимое для активации генов и начала синтеза фермента) после внешнего воздействия на клетки, продуцируют огромные (в 100–1000 раз больше, чем конститутивные изоформы фермента) количества NO. Поскольку высокие дозы NO токсичны для клеток, эта форма фермента считается патологической в отличие от конститутивной. Активность индуцибельной NO-синтазы не зависит от уровня кальция/кальмодулина, поскольку, как полагают, кальмодулин постоянно и прочно связан с ферментом. В настоящее время показано, что не только макрофаги, но многие другие клетки способны при определенных внешних воздействиях, в основном в условиях патологии, синтезировать индуцибельную форму NO-синтазы. Нейрональная и макрофагальная формы фермента находятся в клетках преимущественно в растворенном состоянии — в цитозоле, а эндотелиальная NO-синтаза обычно связана с клеточными мембранами [19].

2. Убихинол

В норме этот радикал не более чем рядовой участник процесса переноса электронов, но при нарушении работы дыхательной цепи он может стать источником других, менее безобидных радикалов, а именно радикалов кислорода. Убихинон (коэнзим-Q) является обязательным и наиболее подвижным компонентом электрон-транспортных цепей, он участвует в удалении протонов из матрикса митохондрий и последующем освобождении их в межмембранное пространство. В соответствии с общепринятой в настоящее время хемиосмотической моделью Питера Митчелла, это обеспечивает сопряжение процессов электронного транспорта и окислительного фосфорилирования [20].

3. Супероксид-анион радикал (*OO⁻)

Первичный радикал кислорода — супероксид. Его образование происходит в 3 участках дыхательной цепи: на уровне NADH-дегидрогеназы, коэнзима Q [21], а так-

же комплекса III митохондрий. Цитохром С является первичным и основным источником супероксид-анион-радикала, который образуется в результате одноэлектронного восстановления кислорода цитохромом С. Подсчитано, что митохондрии могут превращать 2% поглощенного кислорода в супероксид-анион-радикал. Вклад каждой ферментной системы в общую продукцию супероксид-анион-радикала зависит от типа ткани и состояния клеток. Например, вклад семейства ксантиноксидаз в продукцию *O₂⁻ начинает ощущаться только при недостатке молибдена, который является кофактором этого фермента. Вследствие того, что матрикс митохондрий содержит супероксиддисмутазу, супероксид быстро превращается в пероксид водорода, который может выходить через мембрану митохондрий в цитоплазму.

При этом каждая молекула НАДФН, окисляясь, отдает два электрона в цепь переноса электронов, а каждый из этих электронов присоединяется к молекуле кислорода, в результате чего образуется супероксид — (анион) радикал. При восстановлении убихинон превращается в анион-радикал семихинона. Этот радикал не ферментативно взаимодействует с O₂ с образованием супероксидного радикала. В отличие от рассмотренного механизма на этапе переноса электронов при участии цитохромоксидазы (комплекс IV) «утечка» электронов не происходит благодаря наличию в ферменте специальных активных центров, содержащих Fe и Cu и восстанавливающих O₂ без освобождения промежуточных свободных радикалов (см. рис. 3).

В фагоцитах образование супероксидного радикала происходит с участием мембранных НАДФН-оксидаз в результате «респираторного взрыва», о чем будет рассказано в соответствующем разделе (см. рис. 4).

В цитозоле клеток супероксидный анион-радикал генерируется от ксантиноксидазы.

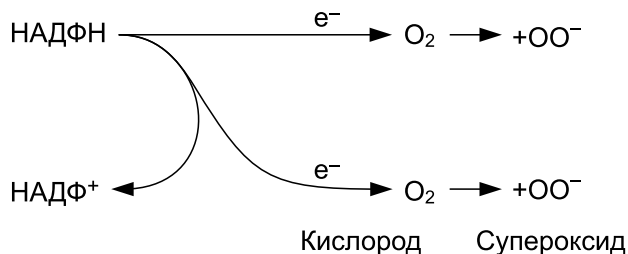


Рис. 4. Образование супероксида в фагоцитах [22]

Супероксид радикал сам по себе обладает малой реакционной способностью и в водной среде может спонтанно дисмутировать. Время его жизни в биологических субстратах составляет около 10^{-6} с [23]. Супероксид-радикал представляет опасность тем, что способен повреждать белки, содержащие железо-серные кластеры, такие как аконитаза, сукцинатдегидрогеназа и НАДН-убихинон оксидоредуктаза.

Клетки стараются избавиться от супероксид-радикалов, для чего они вырабатывают ферменты, называемые супероксиддисмутазами. Эти ферменты являются классическими примерами ферментов «с субстратной индукцией», т. е. синтез и активность их тем больше, чем больше накапливается супероксида и, следовательно, чем больше интенсивность перекисного окисления липидов. И, наоборот, «нормализация» активности супероксиддисмутаза, т. е. переход от большой активности к физиологическому уровню, во многих клеточных системах, большей частью, свидетельствует об уменьшении количества супероксида и, следовательно, об уменьшении перекисного окисления липидов [24].

Различаясь по строению активного центра и структуре полипептидной цепи, все супероксиддисмутаза катализируют одну и ту же реакцию дисмутации супероксидного радикала [25]:



При этом супероксид превращается в кислород и перекись водорода (относящуюся к вторичным радикалам).

Образование супероксид-аниона кислорода имеет важное биологическое значение. Он является высоко-реакционным соединением, которое вследствие высокой гидрофильности не может покинуть клетку и накапливается в цитоплазме. Его превращения приводят к образованию ряда активных окислителей. Он способен активировать NO-синтазу, которая образует в тканях NO-радикал, обладающий свойствами вторичного посредника (активирует растворимую гуанилатциклазу, продукт которой — цГМФ — проявляет вазодилаторные свойства). С другой стороны, супероксид-анион способен снижать содержание NO-радикала, превращая его в пероксинитрит ONOON (см. рис. 5) [3, 7, 25].

Активные формы кислорода

Полное восстановление кислорода происходит на заключительной стадии митохондриального окисления. Химические соединения, в составе которых кислород имеет промежуточную степень окисления, имеют высокую реакционную способность и называются активными формами кислорода [3, 8, 10]. Активные формы кислорода могут легко переходить друг в друга [21]. Примеры таких переходов изображены на рисунке 6. Донорами электронов могут являться металлы переменной валентности. Супероксид, пероксид — активные окислители, что представляет серьезную опасность для многих структурных компонентов клетки. Активные формы кислорода могут отщеплять электроны от многих соединений, превращая их в новые свободные радикалы, инициируя цепные окислительные реакции.

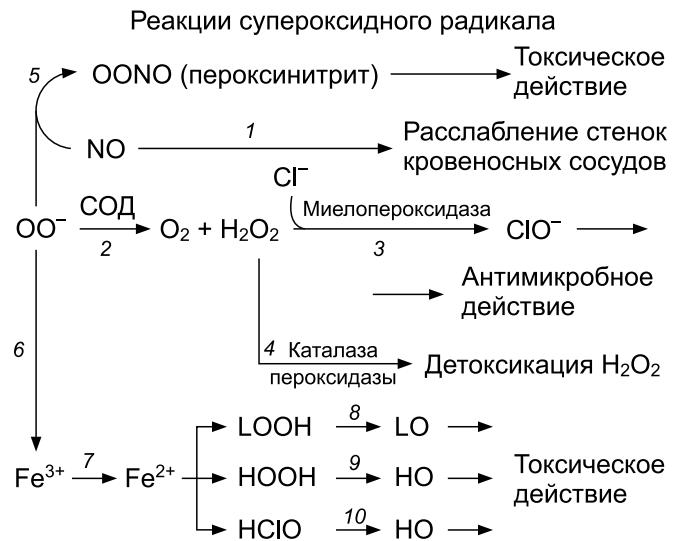


Рис. 5. Реакции супероксидного радикала [25]

Супероксид, пероксид — активные окислители, что представляет серьезную опасность для многих структурных компонентов клетки. Активные формы кислорода могут отщеплять электроны от многих соединений, превращая их в новые свободные радикалы, инициируя цепные окислительные реакции.

Супероксид, образующийся при «разобщении» на цитохроме P-450, может быть источником перекиси водорода и генератором ионов железа из ферритина — компонентов, необходимых для образования различных активных форм кислорода. Действительно, образование супероксида, перекиси водорода и гидроксил радикала показано в реконструированных ферментных системах с использованием различных изоформ цитохрома P-450.

1. Пероксид водорода

Уже на ранних этапах изучения цитохрома P-450 было показано, что при функционировании цитохрома P-450 как в микросомах, так и в реконструированной ферментной системе образуется перекись водорода. Принято считать, что ее образование связано с тем, что в процессе цитохром P-450-зависимого окислительного цикла образующийся тройственный комплекс, включающий цитохром P-450, субстрат и ион супероксида (оксидцитохром P-450), может, помимо основного пути превращения — внедрения кислорода в структуру субстрата, — распадаться с образованием исходного комплекса субстрат-цитохром P-450 и высвобождением супероксида (процесс «разобщения») с последующей его дисмутацией с образованием перекиси водорода [26].

Пероксид водорода (перекись водорода), H_2O_2 — простейший представитель пероксидов. Молекула перекиси водорода сильно полярна, что приводит к возникновению водородных связей между молекулами [21]. Связь O—O непрочна, поэтому H_2O_2 — неустойчивое соединение, легко разлагается. Также этому может поспо-

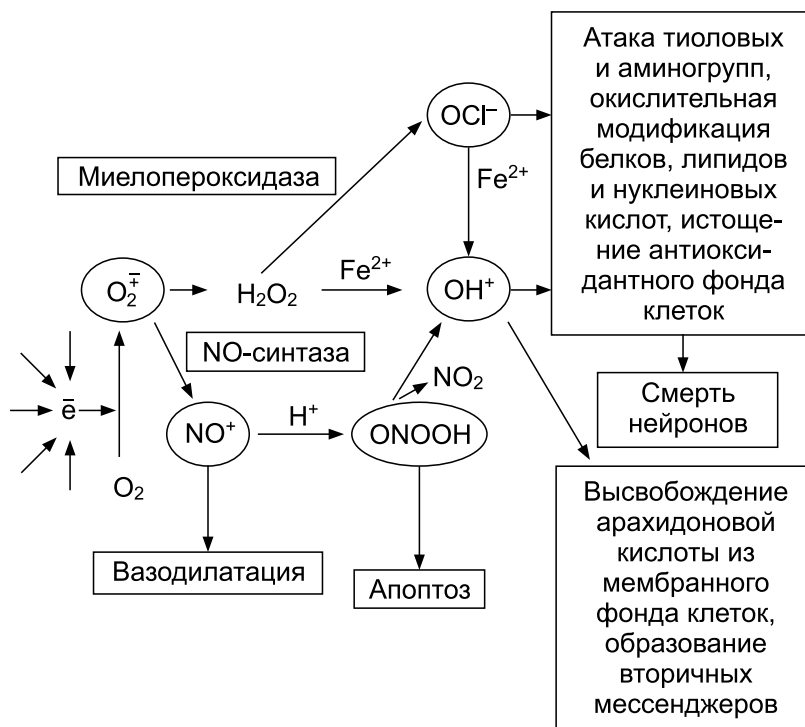


Рис. 6. Взаимопревращения свободных радикалов и их основные функции в тканях [Болдырев А.А., 1996] [13]

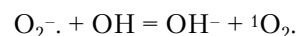
способствовать присутствию ионов переходных металлов и серебра.

Перекись водорода — наиболее стабильный из промежуточных продуктов восстановления O_2 , но и наименее реакционноспособный. У большинства аэробных прокариот H_2O_2 быстро разлагается с помощью гемсодержащих ферментов каталазы и пероксидазы. В отсутствие их H_2O_2 может накапливаться в летальных для организма концентрациях. Пероксид водорода является ключевой молекулой в процессе апоптоза. Увеличение внутриклеточной концентрации H_2O_2 выше критического уровня приводит к снижению внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала (редокс-потенциала) и вызывает апоптоз [27]. Перекись водорода, образующаяся в результате дисмутации супероксидных радикалов, используется для синтеза антимикробного вещества — гипохлорита, ее избыток разлагается ферментами, каталазой и пероксидазами. При недостатке супероксиддисмутазы супероксидные радикалы могут давать неблагоприятные эффекты, главным образом в результате двух реакций: образования ионов двухвалентного железа (из трехвалентного) и связывание оксида азота [13].

2. Синглетный кислород

Синглетный кислород — общее название для двух метастабильных состояний молекулярного кислорода (O_2) с более высокой энергией, чем в основном, триплетном состоянии. В норме O_2 находится в стабильном состоянии, называемом триплетным и характеризующемся наименьшим уровнем молекулярной энергии. В определенных условиях молекула O_2 переходит в одно из

двух возбужденных синглетных состояний (1O_2), различающихся степенью энергизованности и длительностью «жизни» [11]. У большинства живых клеток в темноте основным источником синглетного кислорода служит спонтанная дисмутация супероксидных анионов. Синглетный кислород может возникать также при взаимодействии двух радикалов



Активные формы азота

Реактивные формы азота — токсичные побочные продукты метаболизма оксида азота, образуемого в организме с помощью NO-синтаз. Наряду с реактивными формами кислорода, РФА повреждают клетки. Вредное действие реактивных форм азота описывают словосочетанием «нитрозирующий стресс», по аналогии с «оксидативным стрессом».

1. Пероксинитрит ($ONOO^-$)

Образуется при реакции NO с супероксидом и, в свою очередь, вызывает образование других реактивных форм азота. Пероксинитрит является сильным окислителем. Благодаря своим свойствам он способен вызывать повреждения широкого спектра молекул в клетке, в том числе ДНК и белков [17].

2. Нитротирозин

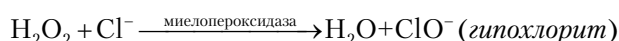
Продукт нитрования тирозина, осуществляемого с участием реактивных форм азота, таких как пероксинитрит и оксид азота (IV). Нитротирозин вырабатывается в организме при некоторых патологических

состояниях [26] и считается маркером NO-зависимого оксидативного стресса. Его обнаруживают в тканях, поврежденных течением заболеваний, например, в роговицах, пораженных кератоконусом. Также нитротирозин может участвовать в патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой, нервно-мышечной ткани [18, 28].

Активные формы хлора

Гипохлорит-анион

Образуется при окислении хлорид-аниона, катализируемого миелопероксидазой нейтрофильных гранулоцитов и в качестве одного из биоцидных факторов (т. н. активных форм кислорода) участвует в защите организма от бактериальных и грибковых инфекций [26].



Активные формы липидов

Липогидропероксиды

Вопрос о роли свободнорадикального перекисного окисления липидов в этиологии и патогенезе атеросклероза обсуждается достаточно давно. Известно, что мембраны клеток и субклеточных органелл, а также липопротеины плазмы крови содержат в своем составе фосфолипиды, в β -положении которых локализованы полиненасыщенные жирные кислоты, легко окисляющиеся в присутствии кислорода до соответствующих гидропероксидов. В качестве индуктора процессов перекисного окисления липидов в биомембранах может выступать гидроксил-радикал (HO^*), образующийся при дисмутации супероксидного анион-радикала ($^*\text{O}_2^-$) в пероксид водорода (H_2O_2), который, так же как и гипохлорная кислота (HOCl), генерирует $^*\text{HO}$ при распаде этих соединений. Липогидропероксиды, образующиеся при свободнорадикальном перекисном окислении ненасыщенных липидов, весьма лабильны и могут подвергаться дальнейшей окислительной деструкции, в связи с чем в процессе перекисного окисления липидов, кроме первичных продуктов окисления, обычно накапливается большое количество вторичных продуктов. Наиболее важными из них являются α , β -ненасыщенные альдегиды (такие как 4-гидроксиноненаль, 4,5-дигидроксицеталь), малоновый диальдегид и продукты взаимодействия альдегидов с аминокислотами соединениями — флюоресцирующие шиффовы основания, а также сложные соединения, образующиеся при полимеризации окисленных липидов и белков — цероидные или возрастные пигменты и липофусцин [29].

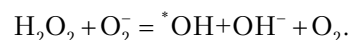
Вторичные радикалы

1. Вторичные радикалы кислорода

Гидроксильный радикал

Гидроксильный радикал относится к реактивным формам кислорода и является наиболее активным компонентом оксидативного стресса. Он образуется в клетке в основном при восстановлении перекиси водорода

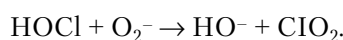
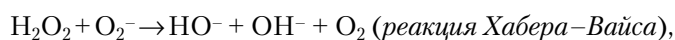
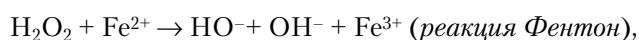
в присутствии переходного металла (такого как железо) [10]:



Время полужизни $t^{1/2}$ гидроксильного радикала *in vivo* очень короткое — около 10^{-9} с, что в совокупности с его высокой реактивной способностью приводит к тому, что он является одним из наиболее опасных агентов, образующихся в организме. В отличие от супероксида, который может быть детоксифицирован супероксиддисмутазой, не существует фермента, который бы элиминировал гидроксильный радикал, из-за слишком короткого времени жизни, недостаточного для диффузии его в активный центр фермента. Особенностью реакций с участием гидроксильных радикалов является их цепной характер (гидроксильный радикал не исчезает, а передается).

Единственная защита клетки от этого радикала — высокий уровень низкомолекулярных антиоксидантов, таких как глутатион.

H_2O_2 и HOCl генерируют свободные радикалы в присутствии Fe^{2+} и O_2^- . Реакции генерирования свободных радикалов перекисью водорода и гипохлоритом



2. Вторичные радикалы липидов

Вторичные радикалы липидов образуются в процессе перекисного окисления.

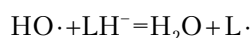
Свободнорадикальное (перекисное) окисление липидов

Процессы свободнорадикального (перекисного) окисления липидов привлекают в настоящее время внимание все большего числа исследователей. Это связано с признанием решающей роли в жизнедеятельности организма биомембран, в структуре которых липиды занимают важное место. Защиту клеток и межклеточного пространства от свободнорадикального повреждения осуществляет антиоксидантная система, в которую входят вещества ферментной и неферментной природы, способные снижать концентрацию свободных радикалов в организме и тем самым тормозить окислительное поражение биологически важных структур. Для изучения свободнорадикальных процессов в настоящее время используют метод хемилюминесценции.

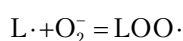
Именно перекисное окисление липидов является основным разрушительным процессом при многих заболеваниях, провоцируя и поддерживая их. Как отмечалось ранее, инициация перекисного окисления липидов начинается с образования гидроксильного или иного другого активного радикала, который отрывает водород из метиленовой группы полиненасыщенных жирных кислот вблизи двойной связи, поскольку последняя

ослабляет углеродно-водородную связь в непосредственной близости от себя. Образующаяся после отнятия водорода молекула-радикал немедленно перестраивает свою конфигурацию, образуя т. н. конъюгированный диен. Диен далее реагирует с кислородом, образуя пероксидный радикал, который уже сам может отнять атом водорода у другой жирной кислоты и т. д. Поэтому по наличию конъюгированных диенов в сыворотке можно судить об интенсивности перекисного окисления липидов, что имеет важное диагностическое значение. Однажды возникнув, цепь свободнорадикальных реакций продолжается до тех пор, пока не исчерпается весь имеющийся «материал» или молекулы-антиоксиданты не прервут злосчастную цепь и ценой собственной жизни не «погасят» имеющиеся свободные радикалы [23–25].

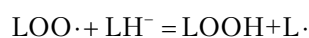
Она протекает в несколько стадий, которые получили названия инициирование, продолжение, разветвление и обрыв цепи [29–31]. Рассмотрим эти стадии подробнее. Инициирование цепной реакции начинается с того, что в липидный слой мембран или липопротеинов внедряется свободный радикал. Чаще всего это радикал гидроксила. Будучи небольшой по размеру незаряженной частицей, он способен проникать в толщу гидрофобного липидного слоя и вступать в химическое взаимодействие с полиненасыщенными жирными кислотами (которые принято обозначать как LH), входящими в состав биологических мембран и липопротеинов плазмы крови. При этом образуются липидные радикалы:



Липидный радикал (L·) вступает в реакцию с растворенным в среде молекулярным кислородом; при этом образуется новый свободный радикал — радикал липоперекиси (LOO·):



Этот радикал атакует одну из соседних молекул фосфолипида с образованием гидроперекиси липида LOOH и нового радикала L*. Чередование двух последних реакций как раз и представляет собой цепную реакцию перекисного окисления липидов:



Существенное ускорение перекисации липидов наблюдается в присутствии небольших количеств ионов двухвалентного железа. В этом случае происходит разветвление цепей в результате взаимодействия Fe²⁺ с гидроперекисями липидов.

Образующиеся радикалы *LO иницируют новые цепи окисления липидов.

В биологических мембранах цепи могут состоять из десятка и более звеньев. Но в конце концов цепь обрывается в результате взаимодействия свободных радикалов с антиоксидантами, ионами металлов переменной валентности (например, теми же Fe²⁺) или друг с другом.

Система контроля концентрации радикалов

Живые клетки имеют системы защиты от повышенной продукции свободных радикалов. Фермент супероксиддисмутаза превращает супероксид-анион кислорода в менее реакционноспособный и более гидрофобный пероксид водорода H₂O₂. Пероксид водорода является субстратом каталазы и глутатионзависимых пероксидаз, которые катализируют его превращение в молекулу воды. Однако пероксид водорода может генерировать гидроксил-радикал в присутствии двухвалентного железа или превращаться в гипохлорит-анион ОСl⁻ ферментом миелопероксидазой [24].

Процессы, протекающие до момента образования гипохлорит-аниона или гидроксил-радикала, локализованы в цитоплазме и контролируются цитоплазматическими ферментами или природными водорастворимыми антиоксидантами. Например, таурин способен связывать гипохлорит-анион в форме хлораминового комплекса, дипептид карнозин и его производные нейтрализуют гидроксил-радикал, а такие соединения, как белок ферритин, связывают железо. Перекисное окисление липидов, иницируемое в гидрофобном пространстве клеточных мембран, способен прерывать широко известный гидрофобный антиоксидант α-токоферол (витамин Е). Его высокая концентрация в биологических мембранах препятствует их повреждению свободными радикалами.

В последние годы наряду с данными о патогенном действии свободных радикалов стали появляться многочисленные данные об их необходимости в определенных концентрациях для регулирования ряда физиологических процессов клетки. Об этом мы поговорим в следующей статье.

Патогенной роли активных форм радикалов при их избыточной концентрации, а также системе антиоксидантной защиты организма также будет посвящены соответствующие статьи.

Литература

1. Дамбаева С. В. Оценка продукции активных форм кислорода методом лазерной проточной цитометрии в клетках периферической крови человека. Иммунология. 2001; 6: 58–60.
2. Любимов Г. Ю. Хемилюминесцентный анализ. Иммунология. 1991; 1: 40–49.
3. Владимиров Ю. А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции. Соросовский образовательный журнал. 1999; 6: 26–32.
4. Стежко Д. В. Новая хемилюминесцентная технология и прибор определения воздействия озона во время проведения сеансов озонотерапии. Новая технология: научн. техн. сборник. 2003; 1: 21–24.
5. Теселкин Ю. О., Владимиров Ю. А. Определение антиоксидантной активности плазмы крови с помощью системы НВ-Н₂O₂-люминол. Вопросы медицинской химии. 1998; 3: 14–21.
6. Farkhutdinov U. R., Farkhutdinov R. R., Petriakov V. V. et al. Effect of mucolytic therapy on the production of reactive oxygen species in the blood of patients with an exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. Ter. Arkh. 2010; 82 (3): 29–32.

7. Bagchi K., Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. Eastern. Mediterranean. Health Journal. 1998; 4 (2): 350–360.
8. Marriott H. M., Jackson L. E., Wilkinson T. S. et al. Reactive oxygen species regulate neutrophil recruitment and survival in pneumococcal pneumonia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2008; 177 (8): 887–895.
9. Fridovich I. Superoxide Anion Radical (O_2^-), Superoxide dismutases, and Related Matters. The J. of Biol. Chem. 1997; 272: 18515–18517.
10. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах. Соросовский образовательный журнал. 2000; 12: 13–19.
11. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах. Лекция. М., 2000: 15.
12. Владимиров Ю. А. Активированная хемилюминисценция и биофлуоресценция как инструмент в медико-биологических исследованиях. Соросовский образовательный журнал. 2000; 1: 16–23.
13. Болдырев А. А., Куклей М. Л. Свободные радикалы в нормальном и ишемизированном мозге. Нейрохимия. 1996; 13 (4): 271–278.
14. Roede J. R., Jones D. P. Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. Environ Mol. Mutagen. 2010; 51 (5): 380–390.
15. Cadenas E., Davies K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free radical biology and medicine. 2000; 29 (3–4): 222–230.
16. Крыжановский Г. Н., Карабань И. Н., Магаева С. В. и др. Болезнь Паркинсона (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика). М.: Медицина, 2002: 336.
17. Szabó C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. Toxicology letters. 2003; 140/141: 105–112.
18. Schleicher M., Brundin F., Gross S. et al. Cell cycle-regulated inactivation of endothelial no synthase through nosip-dependent targeting to the cytoskeleton. Mol. and Cel. Biology. 2005; 25 (18): 8251–8258.
19. Szabó C., Ischiropoulos H., Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. Review. Nature Reviews Drug Discovery. 2007; 6: 662–680.
20. Crugnola V., Lamperti C., Lucchini V. et al. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in muscle from patients with amyotrophic lateral sclerosis. Arch. Neurol. 2010; 67 (7): 849–854.
21. http://biochemistry.ru/biohimija_severina/B5873Part42-294.html
22. <http://medicalplanet.su/Patfiz/134.html>
23. Lucena M. I., García-Martín E., Andrade R. J. et al. Mitochondrial superoxide dismutase and glutathione peroxidase in idiosyncratic drug-induced liver injury. Hepatology. 2010; 52 (1): 303–312.
24. Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006: 556.
25. http://biochemistry.ru/biohimija_severina/B5873Part64-428.html
26. Берберова Н. Т. Из жизни свободных радикалов. Соросовский образовательный журнал. 2000; 6 (5): 39–44.
27. Chen L., Xu B., Liu L. et al. Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPKalpha leading to apoptosis of neuronal cells. Lab. Invest. 2010; 90 (5): 762–773.
28. Killilea D. W., Hester R. et al. Free radical production in hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2000; 279: 408–412.
29. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972: 252.
30. Banni S., Montisci R., Sanfilippo R. et al. Physiological response to lipid peroxidation in ischemia and reperfusion during carotid endarterectomy. Lipids in Health and Disease. 2010; 9: 9–41.

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЙ
КОНСИЛИУМ

ПО ВОПРОСАМ СОТРУДНИЧЕСТВА ПРОСИМ ОБРАЩАТЬСЯ:

- ПУБЛИКАЦИЯ МАТЕРИАЛОВ
в научно-практическом журнале
«Клинико-лабораторный консилиум»

Эмануэль Владимир Леонидович

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

- РЕКЛАМНЫЙ ОТДЕЛ:

Венкович Татьяна Анатольевна
Морозова Ирина Александровна

Тел./ф: (812) 600-22-74,
e-mail: akvatetest@mail.ru

БИОКРИСТАЛЛОМИКА: ПРЕДПОСЫЛКИ, СУЩНОСТЬ, ПЕРСПЕКТИВЫ

А.К. МАРТУСЕВИЧ¹, В.Л. ЭМАНУЭЛЬ²

¹ ФГУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Росздрава, Нижний Новгород, Россия

² ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Росздрава, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В статье рассмотрены исторические основы и дана характеристика современного состояния российских исследований, касающихся изучения свободного и инициированного кристаллогенеза биологических жидкостей организма человека и животных. Сформулировано определение биокристалломики — биологической науки, изучающей закономерности кристаллизации любых биологических объектов с позиций молекулярной биологии и медицины. Кратко охарактеризованы основные научные центры, проводящие исследования по изучению различных (медицинских, биологических, химических, минералогических, физических, математических и др.) сторон феномена структуризации биологических субстратов организма человека и животных. Выделены основные этапы становления, фундаментальные положения и проблемные аспекты биокристаллографии, а также причины ее трансформации в биокристалломику. Показаны новизна и непродолжительность изысканий в данной интегративной области науки, сформулированы основные её задачи, включающие формирование представлений о природе, сущности и механизмах биокристаллогенеза; создание методологической и методической базы для изучения биокристаллов; оценку диагностической ценности исследования биокристаллизации; рассмотрение теоретической и прикладной значимости направленного кристаллоинженеринга; изучение интегративных аспектов взаимодействия биокристалломики со смежными дисциплинами и формирование новых синтетических наук (кристаллогеномика, кристаллотранскриптомика, кристаллопротеомика, кристаллометабомика).

Ключевые слова: биокристалломика, биокристаллоскопические методы.

BIOCRISTALLOMICS: BASIS, ESSENCE, PERSPECTIVES

A.K. MARTUSEVICH¹, V.L. EMANUEL²

¹ Federal State Institution «Nijegorodski Scientific Research Institute of Traumatology and Ortopedics» Roszdrav, Nijny Novgorod, Russia

² State Budget Educational Institution of Higher Professional Education “Saint-Petersburg State Pavlov Medical University, Ministry of Health and Social Development of Russian Federation”, Saint-Petersburg, Russia

Summary. The article discusses the historical basis and modern condition of Russian scientists investigations concerning the free and initiated crystallogenesis in human and animal biological fluids. Article gives the definition of biocrystalloitics as a biological science devoted to the laws of crystallization from point of view of molecular biology and medicine. Authors give brief characteristics of main scientific centers in which the different directions of investigations are performed. In these centers medical, biological, chemical, mineralogical, physical, mathematical aspects of biological substrats (human and animal) structurization phenomenon are investigated. The main stages of development of the new science, its fundamental aspects and problems are discussed. The course of its transformation to biocrystalloitics is also mentioned. The investigations in this field are rather recent and new. The article shows its main tasks including the investigations of nature and mechanisms of biocrystallogenesis, working out the methodologic and methodic base for studies of biocrystalloitics, evaluation of diagnostic informativity of biocrystalloitics, theoretic and practical value of crystalloengineering, investigation of integrative aspects of biocrystalloitics with other disciplines and development of new synthetic sciences (crystallogenomics, crystallotranscriptomics, crystallometabolomics).

Key words: biocrystalloitics, biocrystalloscopic methods, fundamentals.

Данные для корреспонденции:

Мартусевич Андрей Кимович — к. м. н., профессор РАЕ,

с. н. с. отделения экспериментальной медицины

ФГУ «ННИИТО» МЗСР РФ, 603155, Нижний Новгород, Верхне-Волжская наб., д. 18;

тел.: + 7 (909) 144-91-82; e-mail: cryst-mart@yandex.ru

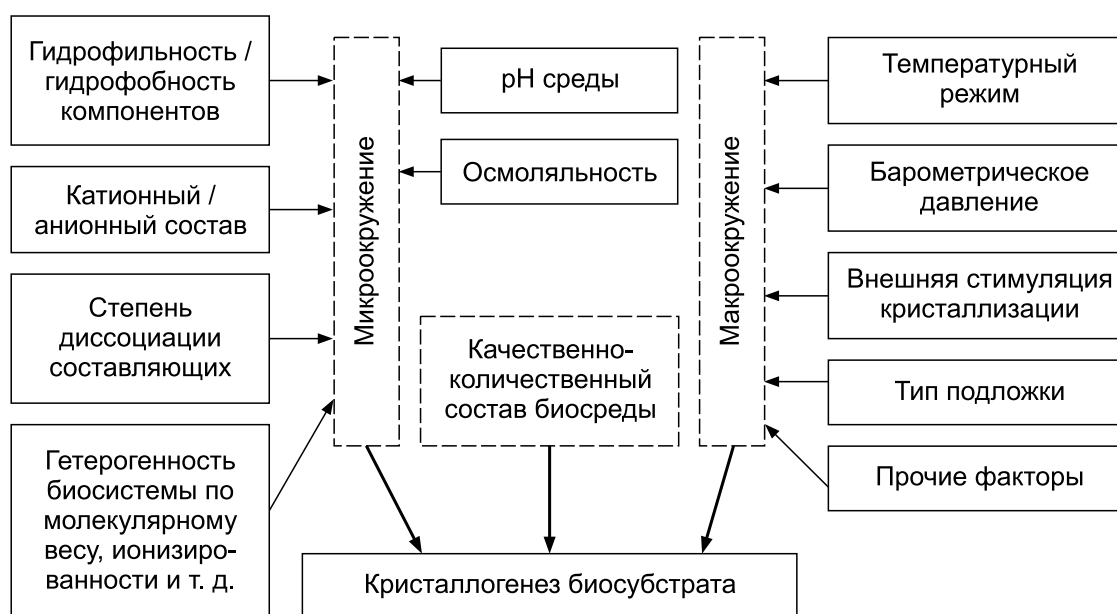


Рис. 1. Факторы, лимитирующие кристаллообразование биосубстратов

Первое упоминание о кристаллообразовании в научном источнике относится к 1730 г., когда в своем труде «Оптика» И. Ньютон описал феномен образования регулярных структур из растворов солей. С этого времени кристаллография стала оформляться как техническая дисциплина, имеющая прежде всего минералогическую направленность. В период с XVIII по XIX в. в России и многих других странах стали стремительно развиваться представления о структуре минералов, обнаруживаемых на территории данных государств. Подобные изыскания были связаны с практическим интересом к строению и механизмам образования минералов, объясняющимся значимостью предсказания новых месторождений и оценки перспективности имеющихся. Этот начальный этап становления кристаллографии можно охарактеризовать как «минералогический».

Как метод исследования кристаллография проявилась, начиная с работ Т.Е. Ловица [8], последователя М.В. Ломоносова, который описал два принципиально новых подхода к анализу растворов, первый из которых — это микрокристаллические реакции, нашедшие в настоящее время широкое применение в судебной медицине, фармации и иммунологии. Другой способ, названный автором «методом выветренных солей», явился прообразом современной кристаллографии.

Длительное время кристаллография оставалась прерогативой технических наук, результатом чего стали современные представления о строении и свойствах кристаллического состояния вещества, а также жидких кристаллах. Из областей, близких к биологии и медицине, кристаллография нашла применение лишь в фармации и судебно-медицинской экспертизе [1, 12]. Фармаколо-

гами кристаллографические методы исследования использовались для анализа структуры синтезируемых лекарственных препаратов [12]. Судебные медики рассматривали кристаллизацию как подход в экспериментальной и практической токсикологии [1], но в последние годы стали появляться единичные работы, имеющие медицинскую направленность. Так, Тахер М. Ассад (1995) изучил особенности кристаллогенеза биологических жидкостей при прижизненном повешении [19].

Непосредственно в медицине кристаллоскопия стала использоваться в течение последних 35 лет. Приставку «био-» к данной дисциплине добавили работы Е.Г. Рапис (1973), которая впервые описала характер кристаллообразования некоторых биосред глаза человека и животных (хрусталик, стекловидное тело и т. д.) [15]. Эти исследования открыли новый этап в развитии биокристаллографии — «эмпирический». Его продолжением стали обширные исследования, выполненные специалистами Московского областного научно-исследовательского клинического института (МОНКИ) им. М.В. Владимирского, заложившими базу одного из основных направлений кристаллоскопического анализа биосубстратов — тезиграфии. Она заключается в оценке результата сокристаллизации изучаемой биосреды и тестового соединения — базисного вещества [6, 18]. Перу этих авторов принадлежит первое предложение о применении различных базисных веществ в качестве кристаллообразователей. Несмотря на достаточно широкий спектр заболеваний (хронический гастродуоденит, хронический панкреатит и др.), для которых была составлена тезиграфическая характеристика, данные работы имели существенный недостаток, который связан

с применением метода в варианте т. н. «классической» тезиграфии, предусматривающей изучение только вышеуказанного образца-сокристаллизанта. В связи с этим данный подход не позволяет учитывать весь значительный массив факторов, которые оказывают влияние на динамику и результат кристаллогенеза (рис. 1). В настоящее время предложены более современные методы тезиграфического анализа.

Другая школа, активно занимающаяся изысканиями в области биокристаллографии, сформировалась под руководством Л.В. Савиной [16]. Данная школа идеологически связана с изучением кристаллообразования сыворотки крови в норме и при патологических состояниях. Основным направлением Л.В. Савиной и ее учеников является также поиск кристаллоскопических маркеров, специфичных для того или иного патологического статуса. Результатом этих многолетних исследований стало издание в 1999 г. монографии «Кристаллоскопические структуры сыворотки крови здорового и больного человека» [16].

Второе направление биокристаллографии — «классическая» кристаллоскопия — основанное на изучении собственной способности биосубстрата к кристаллогенезу, предпосылки которого были первично заложены Е.Г. Рапис, впоследствии получило развитие и усовершенствование благодаря работам В.Н. Шабалина и С.Н. Шатохиной [21, 22]. Ими, аналогично изысканиям Л.В. Савиной, описаны новые маркерные структуры, образуемые биосубстратами при дегидратации в норме и при патологии отдельных органов и систем.

Все эти исследования создали почву для перехода биокристаллографии на новый, «современный» этап, который характеризуется активным вовлечением медиков в изучение особенностей кристаллообразования биологических сред при различных заболеваниях.

Сейчас насчитывается около 15 российских центров, в которых ведутся исследования по проблемам биокристаллогенеза. В числе наиболее крупных из них необходимо назвать Москву (В.Н. Шабалин, С.Н. Шатохина [21, 22], А.Б. Денисов, Г.М. Барер [4], Г.В. Плаксина [13] и др.), Санкт-Петербург (В.Л. Эмануэль [5], Г.А. Тарусинов [18] и др.); Нижний Новгород (А.В. Воробьев, Ю.П. Потехина, Б.Н. Орлов, Л.М. Обухова и др.), Архангельск (А.Л. Волчецкий [3]); Тулу и Тульскую область (В.Н. Кидалов, А.А. Хадарцев [7]; М.Г. Залеский [6] и др.); Волгоград (Т.П. Чухман [20] и др.); Краснодар (Л.В. Савина [16]; О.В. Кокуева и др.); Астрахань (Ю.Ю. Тарасевич [17] и др.); Киров (А.К. Мартусевич, Н.Ф. Камакин, О.Б. Жданова [9–11] и др.) и другие. Усилиями этих ученых создана современная биокристаллография, которая может быть интегрирована в следующих основных положениях:

1. Характер свободного и инициированного кристаллогенеза определяется происхождением биосубстрата и функциональным состоянием организма, от которого получен изучаемый анализ.

2. Могут быть выделены отдельные специфические маркеры/показатели для конкретных патологических состояний.
3. Установленные кристаллоскопические маркеры имеют определенное диагностическое значение.

Накопленный эмпирический объем знаний позволил обосновать развитие самостоятельной интегративной науки — биокристалломики.

Биокристалломика — биологическая наука, изучающая закономерности кристаллизации любых биологических объектов с позиций молекулярной биологии и медицины.

Целью данной новой медико-биологической науки является раскрытие механизмов биокристаллогенеза для разработки возможностей оценки биоинформации различных субстратов и управления биокристаллизацией.

Эта обширная и значимая одновременно для нескольких областей науки цель представляет собой дальнейшую реализацию усилий, прилагаемых специалистами в последние 30–35 лет к созданию нового научного направления, органично интегрирующего современные достижения биологии, медицины, химии, физики и других смежных дисциплин.

В задачи современной биокристалломики входят:

1. Формирование представлений о природе, сущности и механизмах биокристаллогенеза;
2. Создание методологической и методической базы для изучения биокристаллов;
3. Оценка диагностической ценности исследования биокристаллизации;
4. Рассмотрение теоретической и прикладной значимости направленного кристаллоинженеринга;
5. Изучение интегративных аспектов взаимодействия биокристалломики со смежными дисциплинами и формирование новых синтетических наук (кристаллогеномика, кристаллотранскриптомика, кристаллопротеомика, кристаллометаболомика) [10].

В настоящее время выделяется целый ряд аспектов, предопределивших, с наших позиций, формирование биокристалломики как самостоятельной дисциплины:

1. Отсутствие единой теории, объясняющей природу и механизм биокристаллизации. Предлагаемые в настоящее время теории (кристаллизации белка «Протос» [14] и функциональной морфологии биологических жидкостей [21]) не позволяют охватить весь пласт вопросов, связанных с рассматриваемой проблемой, а лишь касаются ее отдельных аспектов (самоорганизация белковых структур и кристаллогенез биосубстратов соответственно).

2. Нереализованность количественной оценки результата кристаллогенеза биологического субстрата. В настоящее время этот аспект в незначительной степени компенсируется внедрением компьютерной обработки микроскопической информации (М.Э. Бузовера [2],

А.Л. Волчецкий [3]), однако данный подход к решению проблемы является значимым прежде всего для научно-исследовательских задач, тогда как в клинической практике в российских условиях он практически неприменим.

3. Невостребованность синтетической идеологии в восприятии феномена биокристаллизации. Исследования, проводимые в области медицинской биокристаллографии, практически не учитывают достижений физической химии, биофизики, биокибернетики и других смежных дисциплин [21, 5, 9–11, 24, 25]. В то же время явление ассоциированной с живыми организмами кристаллизации представляет собой не научный изолированный факт, имеющий исключительно медицинское значение, а комплексный физико-биохимический феномен [3, 7, 9–11, 14, 21–25].

4. Остается практически не освещенным биологический смысл явления биокристаллогенеза.

Установленная медиками диагностическая ценность исследования кристаллообразования и инициирующей способности биосубстратов является только одним из аспектов проблемы, не позволяющим раскрыть истинную биологическую обоснованность изучаемого феномена. В числе основных биологических функций биокристаллогенеза могут быть:

- а) протективная (преимущественно реализуется у низших организмов);
- б) нутритивно-метаболическая (прежде всего, проявляется на клеточном уровне в форме кумуляции нутриентов и метаболитов, а на тканевом и организменном — в виде участия в биохимических процессах);
- в) патогенетическая (на уровне межорганизменных связей, а также на организменном уровне — в виде моче- и желчнокаменной болезни);
- г) информационная;
- д) синтетико-биогенная (отолитовый аппарат, кости, зубная эмаль и т. д.).

Литература

1. Белова А. В. Микрокристаллооптическое обнаружение некоторых производных барбитуровой кислоты при судебно-медицинских исследованиях. Судебно-медицинская экспертиза. 1960; 2: 37–45.
2. Бузоверя М. Э., Шишпор И. В., Шатохина С. Н. с соавт. Морфометрический анализ фаций сыворотки крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2003; 9: 22–23.
3. Волчецкий А. Л., Рувинова Л. Г., Спасенников Б. А. с соавт. Кристаллизация и кристаллография: медико-биологические аспекты. Архангельск, 1999: 374.
4. Денисов А. Б. Алгоритм оценки кристаллических фигур, полученных при высушивании смешанной слюны. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004; 136 (7): 37–40.
5. Залесский М. Г., Эммануэль В. Л. Физико-химическая интерпретация результатов исследования литогенной мочи с помощью диагностикума «Литос-система». Клиническая лабораторная диагностика. 2005; 12: 19–23.
6. Каликштейн Д. Б., Мороз Л. А., Черняков В. Л. Значение тизиграфического метода исследования мочи. Лабораторное дело. 1981; 2: 79–81.

Весь этот пласт проблем обуславливает необходимость подробного и тщательного изучения данной области науки, а, следовательно, ее четкого оформления как биокристалломики. Данная синтетическая дисциплина включает, по нашему мнению, несколько основных направлений:

Экспериментальная биокристалломика — область биокристалломики, занимающаяся расшифровкой механизмов биокристаллогенеза и его моделированием.

Кристаллодиагностика — изучает диагностические перспективы оценки свободного и инициированного кристаллогенеза биосред человека и животных.

Кристаллопатология — направление, исследующее патологические процессы, протекание которых непосредственно или косвенно связано с кристаллообразованием.

Кристаллотерапия — раздел биокристалломики, основной целью которого является изучение и применение способов управления биокристаллогенезом в условиях *in vitro* и *in vivo*, а также разработка принципиально новых технологий лечения заболеваний человека и животных, в патогенезе которых существенную роль играет кристаллообразование, с помощью модуляции (в сторону ингибирования или активации) кристаллогенеза.

Необходимо отметить, что биотехнология кристаллогенеза по своей сущности является истинной нанотехнологией [10, 14, 17, 23], т. к. позволяет проводить манипуляции на уровне структур, имеющих размеры 10-10-10-7 м (0,1–100 нм), что представляет значительный интерес для различных областей современной науки и техники.

Таким образом, к настоящему времени полностью сформирован фундамент для рождения новой синтетической дисциплины преимущественно медико-биологического профиля — биокристалломики.

7. Кудалов В. Н., Хадарцев А. А., Якушина Г. Н. Тезиографические исследования крови и их практические возможности. Вестник новых медицинских технологий. 2004; 11 (1–2): 23–25.
8. Ловиц Т. Е. Показание нового способа испытания соли. Технологический журнал. 1804; 1 (3): 27–41.
9. Мартусевич А. К. Информационная физико-биохимическая теория кристаллизации как отражение морфологии биологических жидкостей. Бюллетень сибирской медицины. 2005; 4 (Прил. 1): 185.
10. Мартусевич А. К. Кристаллографический анализ биосубстратов как новый метод клинической протеомики и метаболомики. Клиническая лабораторная диагностика. 2007; 9: 4–5.
11. Мартусевич А. К., Камакин Н. Ф. Унифицированный алгоритм исследования свободного и инициированного кристаллогенеза биологических жидкостей. Клиническая лабораторная диагностика. 2007; 6: 21–24.
12. Никольская М. Н., Гандель В. Г., Попков В. А. Обнаружение сульфаниламидных препаратов методом кристаллизации в тонком слое. Аптечное дело. 1965; 4: 13–14.

13. *Плакшина Г. В., Римарчук Г. В., Бутенко С. В.* с соавт. Клиническое значение кристаллографического и кристаллоскопического метода исследования мочи. Клиническая лабораторная диагностика. 1999; 10: 34.

14. *Ратис Е. Г.* Белок и жизнь. Самоорганизация, самосборка и симметрия наноструктурных супрамолекулярных пленок белка. М.: МИЛТА-ПКП ГИТ, 2003: 368.

15. *Ратис Е. Г.* Микрокристаллооптический способ использования стекловидного тела человека и животных в норме и при гемофтальме. Вестник офтальмологии. 1976; 4: 62–67.

16. *Савина Л. В.* Кристаллоскопические структуры сыворотки крови здорового и больного человека. Краснодар, 1999: 238.

17. *Тарасевич Ю. Ю.* Механизмы и модели дегидратационной самоорганизации биологических жидкостей. Успехи физических наук. 2004; 174 (7): 779–790.

18. *Тарусинов Г. А.* Кристаллографическое исследование мочи в диагностике и дифференциальной диагностике диффузных заболеваний соединительной ткани у детей. Педиатрия. 1994; 1: 55–57.

19. *Тахер М. А. Ассад.* Судебно-медицинская диагностика прижизненного повешения по кристаллографической структуре биологических жидкостей: автореф. ... канд. мед. наук. Киев, 1995: 16.

20. *Чухман Т. П.* Кристаллографическое исследование слезной жидкости при воспалительных заболеваниях глаз: автореф. ... дисс. канд. мед. наук. Самара, 2000: 20.

21. *Шабалин В. Н., Шатохина С. Н.* Морфология биологических жидкостей человека. М.: Хризопраз, 2001: 304.

22. *Шабалин В. Н., Шатохина С. Н., Девяткин А. А.* с соавт. Морфология жидких сред глаза (новая теория инволютивного катарактогенеза). М.: Медицина, 2004: 244.

23. *Annarelli C., Fornazero J., Bert J.* et al. Crack patterns in drying protein solution drops. Eur. Phys. J. E. 2001; 5: 599–603.

24. *Mollaret R., Sefiane K., Christy J. R. E.* et al. Experimental and Numerical Investigation of the Evaporation into Air of a Drop on a Heated Surface. Chemical Engineering Research and Design. 2004; 82: 471–480.

25. *Yakhno T. A., Yakhno V. G., Sanin A. G.* et al. The informative-capacity phenomenon of drying drops. IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. 2004; 24 (2): 96–104.

ИЗДАТЕЛЬСКО-ПОЛИГРАФИЧЕСКАЯ КОМПАНИЯ
КОСТА

Мы сделали Вашу рукопись Книгой

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.

Издательско-полиграфическая компания «КОСТА»
(812) 445-10-02 www.kostaprint.ru

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ И МОЧИ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

Р.В. МАКАРОВ⁴, А.А. ШЕГОЛЕВ¹, Е.А. СПИРИДОНОВА^{2, 3}, В.Г. ПАСЬКО⁴, Г.Р. САМИГУЛЛИНА⁴, В.Н. ЛЫХИН², И.Б. АЛЧИНОВА⁵, Е.Н. АРХИПОВА⁵

¹ Кафедра хирургических болезней Московского факультета РГМУ

² Кафедра анестезиологии-реаниматологии Московского государственного медико-стоматологического университета

³ ФКНЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития России

⁴ ГКБ №36 Департамента здравоохранения г. Москвы

⁵ ГУ РАМН НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН

Резюме. В проведенной пилотной работе, выполненной на группе больных из 12 человек, исследовали характерные изменения субфракционного состава образцов сыворотки крови и мочи при различных формах острого панкреатита в 1-е и 7-е сутки пребывания в больнице. В результате исследования удалось определить динамические изменения, характерные для отёчного панкреатита, очагового и субтотального деструктивного панкреатита. И в образцах крови и в образцах мочи согласно семиотическому классификатору были обнаружены сдвиги, характеризующиеся высокими процентами мелких и средних частиц (катаболическиподобные, интоксикационноподобные). Однонаправленные изменения в различных биологических жидкостях свидетельствуют о единообразии патологических процессов, происходящих в организме пациентов. У всех пациентов в субфракционном составе сыворотки крови при поступлении отмечено увеличение частиц 1-й и 2-й зон, при этом у больных с ОП и ОчДП преобладало увеличение частиц 2-й зоны. Данные заболевания характеризуются повышением альфа-амилазы в сыворотке крови, особенно в начале заболевания. Амилаза является ферментом класса гидролаз с молекулярной массой 50 тыс., что по размеру соответствует 1–2 зонам. Малое количество наблюдений не позволяет пока сформулировать обоснованное заключение о характере сдвигов субфракционного состава образцов сыворотки крови и мочи у больных с различными формами панкреатита. Вместе с тем, использование метода лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) может стать перспективным направлением в поиске новых лабораторных критериев динамической оценки течения острого панкреатита.

Ключевые слова: острый панкреатит, деструктивный панкреатит, лазерная корреляционная спектроскопия.

PRELIMINARY RESULTS OF BLOOD SERUM AND URINE INVESTIGATION BY METHOD OF LASER CORRELATION SPECTROSCOPY IN ACUTE PANCREATITIS DIAGNOSIS

R.V. MAKAROV⁴, A.A. SHEGOLEV¹, E.A. SPIRIDONOVA^{2, 3}, V.G. PASKO⁴, G.R. SAMIGULLINA⁴, V.N. LICHIN², I.B. ALCHINOVA⁵, E.N. ARCHIPOVA⁵

¹ Chair of surgical diseases, Moscow Faculty of Russian State Medical University

² Chair of anesthesiology and resuscitation of Moscow State Medical Dental University

³ Federal Clinical Scientific Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health care and Social Development of Russian Federation

⁴ State Clinical Hospital N36 Department of Health Care of Moscow

⁵ State Institution of Russian Academy of Medical Sciences "Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences"

Summary. This pilot work was carried out in a group of 12 patients. The specific changes of subfraction composition in samples of blood serum and urine were investigated for various forms of acute pancreatitis at the first and seventh days of hospitalization. The study was done to determine the distinctive dynamic changes of edematous pancreatitis, focal and subtotal destructive pancreatitis. Unidirectional changes in various biological fluids indicate the uniformity of the pathological processes occurring in the patient. All patients in subfraction composition of blood serum on admission was an increase in the particle first and second zones, while in patients with EP and an increase in the particle dominated FP second zone. These diseases are

characterized by an increase of alpha-amylase in serum, especially early in the disease. Amylase is an enzyme class of hydrolases with molecular weight 50 000. That the size corresponds to 1–2 zones. A small number of observations does not allow us to give a reasoned opinion about the nature of shifts of subfraction composition in samples of blood serum and urine for patients with different types of pancreatitis. However, by the primary results, the LCS method can be considered as a promising direction in the search of laboratory criteria for acute pancreatitis severity.

Key words: acute pancreatitis, destructive pancreatitis, laser correlation spectroscopy.

Данные для корреспонденции:

Макаров Рафаэль Викторович — врач-реаниматолог Городской клинической больницы № 36 г. Москвы; 105187, г. Москва, ул. Фортунатовская, д. 1, тел.: (499) 369-01-61, e-mail: drmakraf@drmakraf.ru

В структуре экстренной хирургической патологии острый панкреатит занимает третье место после острого аппендицита и острого холецистита [2, 3]. Вместе с тем, несмотря на распространенность заболевания и многочисленность опубликованных результатов научных исследований по данной проблеме, остается много спорных вопросов как в тактике лечения указанных патологических состояний (отсутствует единая концепция к показанию и объему оперативного лечения, нет общепринятых схем консервативной терапии), так и в регламенте лабораторного мониторинга тяжести состояния больных.

В клинической практике для определения тяжести и прогноза течения отечного панкреатита (ОП) и деструктивного панкреатита (ДП) чаще всего используется лабораторный анализ сыворотки крови в сочетании с клиническими данными. Однако лабораторная диагностика не имеет строгой специфичности для верификации стадии заболевания. В настоящее время актуальной задачей является разработка доступных для широкого рутинного использования методов определения лабораторных критериев отечной и деструктивной форм острого панкреатита. Результатам исследований мочи при ОП и ДП (в том числе — изменениям субфракционного состава образца) посвящено значительно меньшее число исследований.

Целью пилотного исследования являлось выявление характерных изменений субфракционного состава сыворотки крови и мочи при остром отечном (ОП), очаговом (ОчДП) и субтотальном деструктивном (СубтДП) панкреатите с помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии.

Метод лазерной корреляционной спектроскопии в биологии и медицине используется с 1960-х годов. Он основан на регистрации и изучении спектральных характеристик светорассеяния когерентного монохроматического излучения, проходящего через различные среды. С помощью метода ЛКС возможны определение размеров макромолекул в диапазоне от 1 до 10 тыс. нм и расчет распределения частиц по их размерам. В зависимости от концентрации частиц того или иного размера и соотношения между ними изменяется их вклад в общее светорассеяние излучения. Использованный нами

метод ЛКС в последней модификации позволяет определить субфракционный состав образца плазмы/сыворотки крови и мочи с распределением на так называемые спектральные зоны, соотношение которых определяет степень выраженности метаболических сдвигов.

Изменение физиологического состояния организма приводит к изменению метаболических процессов, что в свою очередь ведет к изменению состава биологических жидкостей. Определение субфракционного состава нативных биологических жидкостей дает точное представление о процентном соотношении составляющих их биосубстратов и позволяет получить интегральные показатели, отражающие динамическое состояние изучаемой системы.

Материалы и методы

Субфракционный состав биологических жидкостей регистрировали, используя лазерный корреляционный спектрометр ЛКС-03-«ИНТОКС», собранный в лаборатории молекулярной и радиационной биофизики Санкт-Петербургского института ядерной физики РАН и утвержденный комитетом по новой медицинской технике МЗ РФ для определения размеров микрочастиц в биологических жидкостях (Сертификат RU.C. 39.003.A N5381).

В работе использовали сыворотку крови и мочу 12 человек с острым панкреатитом (5 пациентов — с ОП, 3 пациента — с ОчДП, 4 пациента — с СубтДП). Средний возраст в исследуемой группе составил $43,2 \pm 5,5$ года (9 мужчин, 3 женщины). Первичный забор проб сыворотки крови и мочи у всех больных осуществляли в течение 1-х суток с момента их поступления в стационар; повторный забор проб проводили на 7-е сутки с момента поступления. Во всех случаях заболевания проводили терапию соответственно протоколам ведения больных с ОДП: подавление секреторной деятельности поджелудочной железы, обезбоживание (включая эпидуральную и паравертебральную анестезию), инфузионная и дезинтоксикационная терапия с использованием экстракорпоральной детоксикации на аппарате «Призма» в различных режимах, зондовая декомпрессия желудка, антибактериальная терапия, парентеральное и/или энтеральное питание.

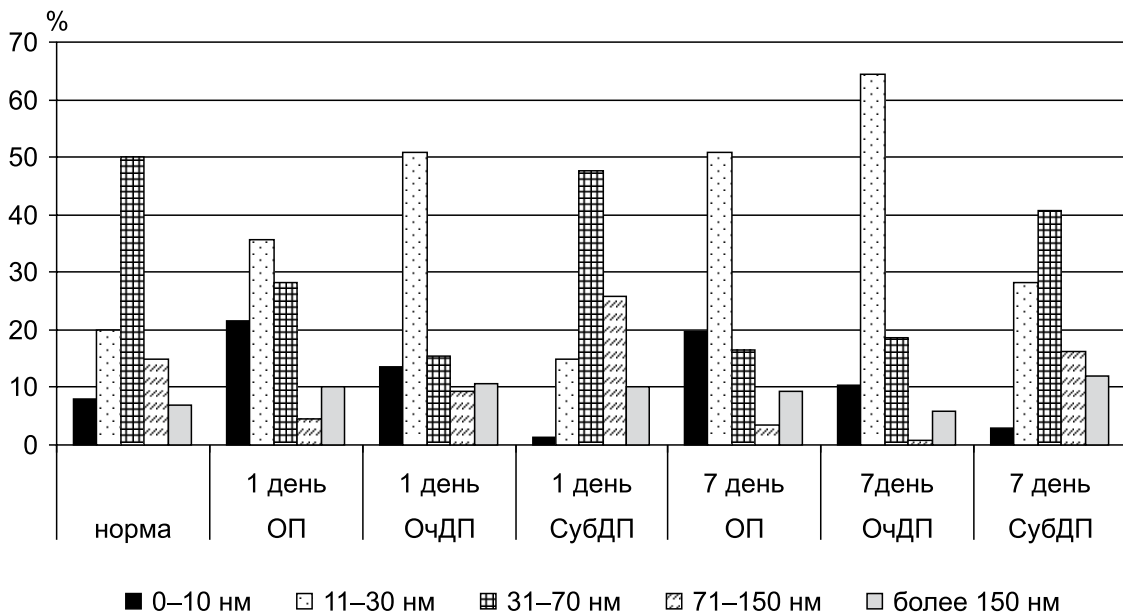


Рис. 1. ЛК-спектры сыворотки крови пациентов с острым панкреатитом на 1-е и 7-е сутки лечения. По оси ординат – процентный вклад в светорассеяние частиц разного размера

В субфракционном составе образца сыворотки крови таких зон выделено пять [1]: 1 зона – от 0 до 10 нм; 2 зона – от 11 до 30 нм; 3 зона – от 31 до 70 нм; 4 зона – от 71 до 150 нм; 5 зона – от 151 нм и выше. Трактовку полученных результатов осуществляли по следующим критериям: при превалировании процессов сенсибилизации, аутоиммунной аллергизации в спектре начинают преобладать молекулы размером выше 150 нм; при патологических состояниях, сопровождающихся повреждением тканей и накоплением молекул промежуточного размера (чаще всего гликолипопротеиновых комплексов) повышается уровень частиц от 31 до 70 нм; при нарастании интоксикационных процессов в организме отмечается отчетливое накопление частиц размером от 10 до 30 нм; при выраженной тканевой дистрофии (при терминальных стадиях гепатита, онкологии, тяжелых obstructивных процессах в легочной и печеночной тканях) происходит повышенное накопление частиц размером ниже 10 нм [2, 4, 7].

В субфракционном составе мочи выделено четыре зоны: 1-я зона – от 0 до 75 нм; 2-я зона – от 76 до 220 нм; 3-я зона – от 221 до 1500 нм; 4-я зона – от 1500 нм и выше. Трактовка полученных результатов осуществляется по следующим критериям: при превалировании процессов сенсибилизации, аутоиммунной аллергизации в спектре начинают преобладать молекулы размером выше 1500 нм; при нарастании интоксикационных процессов в организме отмечается отчетливое накопление частиц от 76 до 220 нм; при выраженной тканевой дистрофии (при терминальных стадиях гепатита, онкологии, тяжелых obstructивных процессах в легочной и печеночной тканях) происходит повышенное накопление частиц размером ниже менее 75 нм [1, 5].

В каждой зоне выделяют три степени выраженности признака: начальная (1), средняя (2), выраженная (3). С помощью специальной программы получаемые данные переводятся в формат гистограммы, визуально отображающий вклад той или иной субфракции частиц в светорассеяние излучения, что облегчает их анализ [1].

Результаты

И в образцах крови и в образцах мочи согласно семиотическому классификатору были обнаружены сдвиги, характеризующиеся высоким процентами мелких и средних частиц (катаболическиподобные, интоксикационноподобные). Однонаправленные изменения в различных биологических жидкостях свидетельствуют о единообразии патологических процессов, происходящих в организмах пациентов.

У всех пациентов в субфракционном составе сыворотки крови при поступлении отмечено увеличение частиц 1-й и 2-й зон, при этом у больных с ОП и ОчДП преобладало увеличение частиц 2-й зоны (рис. 1). Данные заболевания характеризуются повышением альфа-амилазы в сыворотке крови, особенно в начале заболевания. Амилаза является ферментом класса гидролаз с молекулярной массой 50 тыс., что по размеру соответствует 1–2 зонам. У пациентов с СубДП отмечается увеличение вклада в светорассеяние частиц 3-й зоны (31–70 нм), что можно объяснить накоплением продуктов деструкции ткани поджелудочной железы, которое у данных обследуемых развивается уже на ранней стадии заболевания. Повышение частиц в 5-й зоне при поступлении у всех групп больных было примерно одинаковым.

На 7-е сутки во всех группах больных количество частиц во 2-й зоне продолжало увеличиваться, что мож-

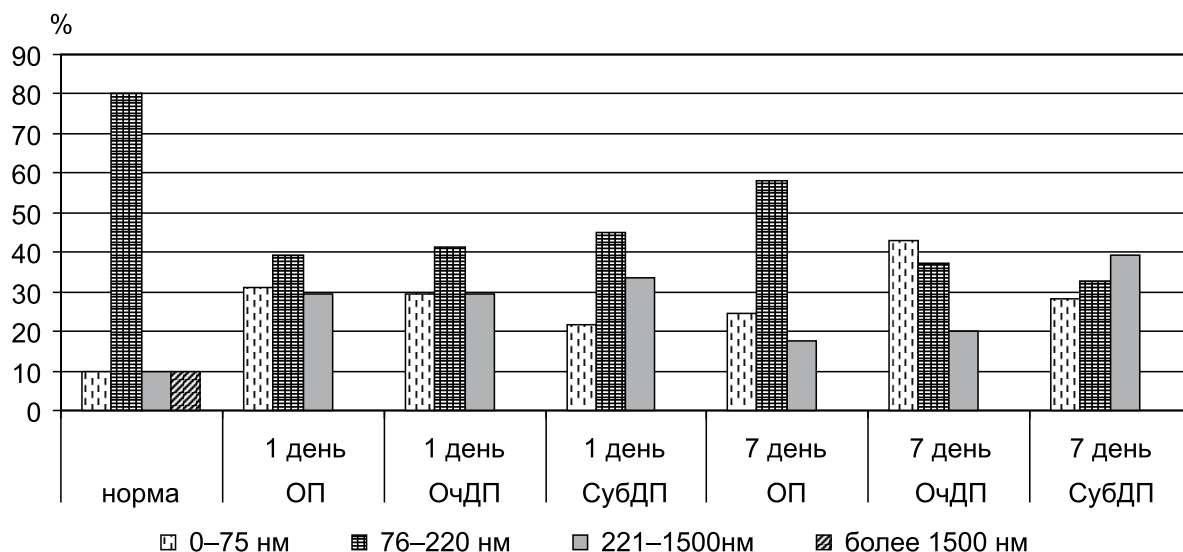


Рис. 2. ЛК-спектры мочи пациентов с острым панкреатитом на 1-е и 7-е сутки лечения. По оси ординат — процентный вклад в светорассеяние частиц разного размера

но объяснить сохраняющимися катаболическими изменениями у больных с острым панкреатитом. Изменения в 3-й зоне у больных разных групп происходили разнонаправлено. У больных с ОП количество частиц в этой зоне уменьшалось в 2 раза, у больных с ОчДП незначительно увеличилось, а у больных с СубДП несколько уменьшилось. Уменьшение количества частиц в 3-й зоне у больных с ОП можно объяснить снижением выраженности интоксикации в этой группе больных к 7-м суткам, в то время как у больных с ОчДП и СубДП выраженность интоксикации сохранялась. В 5-й зоне у больных с ОчДП отмечено снижение частиц в 2 раза, у больных с ОП и СубДП изменение количества частиц было незначительным.

Во всех группах пациентов в субфракционном составе образцов мочи при поступлении преобладали частицы 2-й зоны (рис. 2).

В дальнейшем в группе с ОП количество частиц увеличивалось, у пациентов с ОчДП увеличивается вклад

мелких частиц, у пациентов с СубДП увеличивается процентный вклад в светорассеяние крупных частиц. Данная динамика, вероятно, связана с различной степенью выраженности дисфункции почек у разных групп больных.

Заключение. В рамках настоящей работы изложены предварительные результаты применения метода лазерной корреляционной спектроскопии при отслеживании течения острых панкреатитов. Показано наличие специфических ЛК-гистограмм сыворотки крови и мочи при СубДП, что может быть использовано для дифференциальной диагностики. Кроме того, отличия гистограмм в первые и седьмые сутки позволит использовать результаты для мониторинга состояния пациентов, прогнозирования и оценки эффективности лечения. Исследование будет продолжено, чтобы сделанные на малой выборке наблюдения не привели к ошибочным результатам.

Литература:

1. Бажора Ю. И., Носкин Л. А. Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине. Одесса: Друк, 2002: 400.
2. Лобзин В. С., Нисевич И. И., Омельченко А. Г. и соавт. Лазерная корреляционная спектроскопия сыворотки крови в оценке эффективности гемосорбции у больных миастенией. Бюл. экспер. биологии и медицины. 1991; 3: 259–202.
3. Лысенко М. В., Урсов С. В., Пасько В. Г. и др. Острый панкреатит: дифференцированная лечебно-диагностическая тактика. М.: Литера, серия «Библиотека хирурга», 2010: 192.
4. Мерлич К. И., Гешелин С. А., Носкин Л. А. и соавт. Лазерная корреляционная спектроскопия в исследовании субфракционного состава плазмы крови больных с желудочным кровотечением, череп-

но-мозговой травмой и интоксикациями. Бюл. экспер. биологии и медицины. 1993; 8: 220–222.

5. Носкин Л. А., Дробченко Е. А., Ломакин А. В., Носкин В. А. Применение лазерной корреляционной спектроскопии для изучения биологических объектов в растворах. Л.: Наука, 1987: 90–95.

6. Савельев В. С., Филимонов М. И., Буневич С. З. Панкреонекрозы. М.: Медицинское информационное агентство, 2008: 264.

7. Сазонец О. И., Эммануэль В. Л., Хоровская Л. А. Использование лазерной корреляционной спектроскопии для изучения легочного метаболизма у больных с бронхиальной астмой. Клиническая лабораторная диагностика. 2002; 10: 19–21.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА

А. П. ЛИХОНОСОВА, Н. П. ЛИХОНОСОВ

ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова
Минздравсоцразвития России, студенты 362 группы
Научный руководитель — д. м. н., проф. А.А. Жлоба

Резюме. Для диагностики, контроля лечения, профилактики осложнений сахарного диабета в практике используют различные лабораторные показатели, среди которых определение уровня гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови и микроальбумина в моче занимает важное место. **Цель работы** — анализ существующих аналитических методов для ранней диагностики и контроля осложнений СД. **Методы.** Сравнительный анализ методов определения HbA1c и МАУ: хроматография (высокоэффективная жидкостная хроматография ВЭЖХ); электрофоретический метод и электрофокусирование (капиллярный электрофорез, КЭ); колориметрический метод; нефелометрический и турбидиметрический анализ; иммунохимические методы. **Результаты.** ВЭЖХ позволяет идентифицировать вещества на уровне следовых количеств, имеет высокую степень разрешения и сверхчувствительность. Недостатки ВЭЖХ: дорогой метод; не применим для скрининга. Преимущества КЭ по сравнению с ВЭЖХ: высокая эффективность разделения за счет плоского профиля электроосмотического потока; экономичность и малый расход реактивов. Недостаток метода КЭ: незаряженные молекулы не могут разделяться капиллярным электрофорезом. Используемая для детекции флуоресценция применима только для веществ с естественной флуоресценцией, но не может быть использована для определения нефлуоресцирующих образцов. Радиальная иммунодиффузия и радиоиммунный метод являются простыми и недорогими. Недостатки: длительный инкубационный период для первого и ограниченный срок годности для второго. Иммунотурбидиметрия используется для количественного определения веществ, имеет высокую стоимость. При скрининге МАУ используют тест-полоски. При положительном результате наличие МАУ необходимо подтвердить с помощью других методов. Преимуществами являются готовая фабричная калибровка, быстрое (1,5 минуты) получение результатов, что позволяет ее считать экспресс-методом. **Выводы.** Проведенный сравнительный анализ указанных методов позволил установить, что референсными методами для определения HbA1c являются ВЭЖХ и КЭ; основной для микроальбумина — иммунохимический метод. Рациональный выбор методов особенно актуален для российской науки и практики.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез (КЭ), гликированный гемоглобин, микроальбуминурия.

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ANALYTICAL METHODS APPLIED TO EARLY DIAGNOSTICS OF COMPLICATIONS OF A DIABETES

A. P. LIHONOSOVA, N. P. LIHONOSOV

State budget educational institution of higher professional education "St. Petersburg Pavlov State Medical University, Ministry of Health Care and Social Development"

Summary. Among different laboratory indicators used for diagnosis, treatment and maintenance of complications of diabetes mellitus, the important part belongs to blood level of glycated hemoglobin (HbA1c) and mikroalbuminuria. The aim of the study was to analyse the existing methods used for early diagnosis and control of diabetes complications.

Methods. Comparative analysis of following methods used for HbA1c and mikroalbuminuria was performed: highly effective liquid chromatography (HPLC); electrofocusing capillary electrophoresis (CE); colorimetric method; nephelometric and turbidimetric analysis; immunochemical methods.

Results. HPLC allows to identify substances at trace quantities level, has high degree of the permission and supersensitive. However, HPLC is an expensive method; not applicable for screening. Advantages of CE in comparison with HPLC are high efficiency of division at the expense of a flat profile of an electroosmotic stream; profitability and the small expense of reactants. Disadvantages of CE method are following: molecules without electric charge can't be divided by capillary electrophoresis. Fluorescence is applicable only for substances with natural fluorescence, but can't be used for definition of not fluorescing samples. Radial immunodiffusion and radio immune methods are simple and inexpensive. However, long incubation period is disadvantage of the first and limited working life for the second. Immunoturbidimetriya, used for

quantitative analysis of substances, is rather expensive. For screening of microalbuminuria we can use test strips. Its positive result is necessary, but needs confirmation of microalbuminuria by use of other methods. Advantage is already performed calibration and quick (1,5 minutes) obtaining of results, so we can recommend it as a good express method.

Conclusions. *Comparative analysis of the described methods showed that for HbA1c the reference methods can be HPLC and CE and for mikroalbuminuria — an immunochemical method. The rational choice of methods is especially actual for the Russian science and practice.*

Keywords: *high performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE), glycated hemoglobin (HbA1c), microalbuminuria.*

Данные для корреспонденции:

Лихоносова Анна Павловна,

студентка ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И. П. Павлова,

197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8,

e-mail: lihonosova.ap@mail.ru

Введение

В развитых странах распространенность сахарного диабета (СД) достигает 5–7% от общей популяции [1]. СД приводит к развитию острых и хронических осложнений, приводящих к ранней утрате трудоспособности и высокой смертности. Основными хроническими последствиями диабета являются: сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), нефропатия, невропатия, ампутация и ретинопатия. С возрастом частота СД возрастает, и среди лиц, достигших 65 лет, встречается более чем у 15% [22, 32]. Установлено, что соотношение числа лиц с установленным СД к числу лиц с недиагностированным СД и с латентным, скрытым СД составляет 1:2,5:3 [3]. Для диагностики СД наиболее часто используют определение уровня глюкозы в крови. Однако в последние десятилетия в связи с более детальным изучением патогенеза этого заболевания появились новые методы ранней диагностики как самого СД, так и маркеров его осложнений, что улучшает контроль и позволяет прогнозировать течение СД [8]. В число таких маркеров входят гликированный гемоглобин и микроальбуминурия.

В практику здравоохранения активно внедряются современные методы биохимического тестирования. Поэтому возникла необходимость подробного освещения известных различных лабораторных методов ранней диагностики и контроля осложнений СД, уточнения ценности каждого метода и целесообразности выбора того или иного метода.

Для достижения поставленной цели — проведения сравнительного анализа существующих аналитических методов для ранней диагностики и контроля осложнений СД — были изучены протоколы различных лабораторных методик; уточнены маркеры ранней диагностики осложнений СД, выяснены биохимические аналитические методы для определения параметров ранней диагностики осложнений СД; уточнена клиническая значимость и диагностическая ценность наиболее эффективных методов; проведен сравнительный анализ изученных методов для определения параметров ранней диагностики осложнений СД.

Сравнительный анализ существующих аналитических методов

Для диагностики, контроля лечения, профилактики осложнений СД в практике используют определение уровня глюкозы в крови, в моче, поиск наличия ацетона и микроальбумина в моче, изучение уровня гликированного гемоглобина и фруктозамина. С углублением знаний о причинах возникновения СД появилась потребность поиска иммунологических маркеров СД. Учитывая тот факт, что некоторые типы СД относятся к аутоиммунным, поиск иммунных комплексов применяют не только для диагностики и уточнения типа диабета, но и для раннего выявления аутоиммунного поражения инсулярного аппарата поджелудочной железы. Применяется методика оценки количественного определения остаточной секреции инсулина по уровню С-пептида. Выделяют следующие антитела к островковому аппарату поджелудочной железы: ICA (Islet cell antibodies) — антитела против антигена цитоплазмы клеток островка Лангерганса; IAA (Insulin autoantibodies) — антитела к инсулину; GADA — антитела к декарбоксилазе глютаминовой кислоты (энзима β-клеток); IA-2A (Insulinoma associated 2 autoantibodies) — антитела к фосфатазе белка тирозин; ZnT8 — недавно открытый антиген к островковому аппарату поджелудочной железы [28, 41, 43].

Среди перечисленных параметров особо выделяют маркеры ранней диагностики осложнений СД. Они используются как для диагностики СД, так и для раннего выявления его осложнений. К таким **маркерам** относят определение уровня **гликированного гемоглобина** (HbA1c) и выявление **микроальбуминурии** (МАУ).

Рекомендовано определять уровень **HbA1c** потому, что этот показатель указывает на среднюю концентрацию глюкозы за последние два–три месяца [31, 35]. Проводится дискуссия о возможности использования показателя HbA1c в качестве критерия ранней диагностики СД при проведении скрининговых исследований [26]. Установлено, что повышенные уровни HbA1c предсказывают сердечно-сосудистые риски у больных с СД [39]. Определение уровня HbA1c у пациентов важно и с точ-

ки зрения степени компенсации СД [21]. Оптимальная терапия больных с СД требует определять целевые значения уровня HbA_{1c}, чтобы минимизировать долгосрочный риск поздних осложнений диабета так же, как и краткосрочный риск опасной для жизни гипогликемии [17].

Определение МАУ применяется для ранней, доклинической диагностики диабетической нефропатии (ДН). В классификации ДН (Mogensen С. Е., 1983) эта стадия определена как III начальная стадия ДН (стадия микроальбуминурии), и, что очень важно, является при адекватном лечении обратимой [4]. МАУ – выделение альбумина в моче в количестве 30–300 мг за сутки. Раннее выявление белка в анализе мочи позволяет диагностировать начальные стадии нарушений функции почечных клубочков (нефропатии – как осложнения СД, гипертонической болезни). Выявление МАУ на самой ранней стадии необходимо для своевременного назначения лечения с целью профилактики прогрессирования ДН, которая, развиваясь, приводит к ухудшению очистки крови от азотистых шлаков и развитию хронической почечной недостаточности, уремии. Поэтому перед клиницистами ставится задача как можно раньше выявить МАУ, используя наиболее эффективные аналитические методы [7, 16, 18].

Современная наука предлагает различные аналитические методы для определения HbA_{1c} и МАУ: хроматография (катионнообменная хроматография высокого и низкого давления, ионообменная хроматография, аффинная хроматография, ВЭЖХ); электрофоретический метод и электрофокусирование (капиллярный электрофорез, КЭ); колориметрический метод с использованием тиобарбитуровой кислоты; нефелометрический и турбидиметрический анализ; иммунологические методы.

Хроматография – метод разделения веществ и определения их физико-химических характеристик, основанный на различии скоростей движения и размывания концентрационных зон исследуемых компонентов, которые движутся в потоке подвижной фазы, причем исследуемые вещества находятся в обеих фазах. Необходимым условием разделения анализируемых соединений является различие в их распределении между подвижной и неподвижной фазами. Основой хроматографического разделения является участие компонентов разделяемой смеси в сложной системе Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий (преимущественно межмолекулярных) на границе раздела фаз [5, 7, 14, 20].

Жидкостная хроматография – вид хроматографии, в которой подвижной фазой (элюентом) служит жидкость. Неподвижной фазой может быть твердый сорбент, твердый носитель с нанесенной на его поверхность жидкостью или гель. Различают колоночную жидкостную хроматографию, в которой через колонку, заполненную неподвижной фазой, пропускают порцию разделяемой смеси веществ в потоке элюента (под давлением или под действием силы тяжести), и тонкослойную жидкостную

хроматографию, в которой элюент перемещается под действием капиллярных сил по плоскому слою сорбента, нанесенного на стеклянную пластинку или металлическую фольгу, вдоль пористой полимерной пленки, по поверхности цилиндрической кварцевой или керамической палочки, по полоске хроматографической бумаги. Разработан также метод тонкослойной жидкостной хроматографии под давлением (элюент прокачивают через слой сорбента, зажатого между пластинами). В ВЭЖХ (англ. HPLC, High performance liquid chromatography) используют колонки диаметром до 5 мм, плотно упакованные сорбентом с частицами малого размера (3–10 мкм, сейчас есть до 1,8 мкм), и давление для прокачивания элюента до 3,107 Па (метод называют также хроматографией высокого давления). Это позволяет разделять сложные смеси веществ быстро и полно (среднее время анализа от 3 до 30 мин). Варианты ВЭЖХ – микроколоночная хроматография на наполненных колонках малого диаметра и капиллярная хроматография на полых и наполненных сорбентом капиллярных колонках. По механизму разделения анализируемых или разделяемых веществ ВЭЖХ делится на адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, лигандообменную и другие. Следует иметь в виду, что в практической работе разделение часто протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно. Так, эксклюзионное разделение бывает осложнено адсорбционными эффектами, адсорбционное – распределительными, и наоборот. При этом, чем больше различие веществ в пробе по степени ионизации, основности или кислотности, по молекулярной массе, поляризуемости и другим параметрам, тем больше вероятность проявления другого механизма разделения для таких веществ [4–7, 20].

К жидкостной хроматографии относят также гидродинамическую хроматографию, где неподвижная фаза отсутствует. В этом случае скорость потока элюента максимальна в центре полого капилляра и минимальна у его стенок, а разделяемые компоненты распределяются между движущимися с разной скоростью слоями элюента в соответствии со своими размерами или под влиянием наложенного в поперечном направлении внешнего силового поля (центробежного, электрического, магнитного) [7].

Аффинная хроматография – разновидность адсорбционной, при которой связывание происходит в соответствии со специфическими свойствами двух молекул. Взаимодействие происходит за счет разных сил: ионных, водородных, гидрофобных и других в зависимости от конформации и размера молекул. В аффинной хроматографии используется нерастворимый носитель, на котором иммобилизуется соединение, называемое лигандом; он особым образом связывает подлежащий очистке продукт, находящийся в подвижной, обычно жидкой фазе. Лиганд удерживается за счет ковалентных связей, иногда пользуются ионным обменом, адсорбци-

ей и др. Раствор, в котором находятся молекулы, вступает в контакт с неподвижным лигандом. Из всех веществ удерживаются те, чьи молекулы способны соединяться с лигандом. Разрыв связей может происходить за счет действия агента, связывающегося с молекулой вместо лиганда, или агента, способного связываться с лигандом вместо молекулы [4–7, 20].

Метод капиллярного электрофореза (КЭ), известный также как **капиллярный зональный электрофорез** (англ. **CZE**), основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора вводят в капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером — электролитом. После подачи к концам капилляра высокого напряжения (до 30 кВ) компоненты смеси начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей в первую очередь от заряда и массы (точнее — величины ионного радиуса), и в разное время достигают зоны детектирования. Полученная последовательность пиков называется электрофореграммой, при этом качественной характеристикой вещества является параметр удерживания (время миграции), а количественной — высота или площадь пика, пропорциональная концентрации вещества. Применяется в биохимии и медицине: для определения белков и аминокислот в биожидкостях, гликозилированного гемоглобина и исследования фармакокинетики [4–7, 20].

Колориметрический метод основан на образовании окрашенного комплекса продуктов гидролиза фруктозы с тиобарбитуровой кислотой (тиобарбитуровый метод после кислотного гидролиза).

В **нефелометрическом и турбидиметрическом анализе** используется явление рассеяния света твердыми частицами, находящимися в растворе во взвешенном состоянии [4, 5, 7, 20].

Метод, в котором используют интенсивность прошедшего света I_t , называют **турбидиметрией**, а метод с измерением светорассеяния образца — **нефелометрией**. При турбидиметрических измерениях величина, называемая мутностью, соответствует оптической плотности и может быть определена из соотношения, аналогичного основному закону светопоглощения:

$$S = \lg(I_0/I) = k \cdot b \cdot N,$$

где S — мутность; k — коэффициент пропорциональности, называемый коэффициентом мутности; b — длина пути; N — число рассеивающих частиц в единице объема.

Для **турбидиметрических измерений** можно использовать любой фотометр или спектрофотометр. Если растворитель и рассеивающие частицы бесцветны, максимальная чувствительность достигается при использовании излучения голубой или ближней ультрафиолетовой области. Для окрашенных систем оптимальную длину волны необходимо подбирать экспериментально.

Используемое в нефелометрии расчетное соотношение следующее:

$$I = K_a \cdot c \cdot I_0,$$

где K_a — эмпирическая константа системы (a — угол, под которым проводят измерения); c — концентрация.

Конструкции приборов для нефелометрических и люминесцентных измерений идентичны, поэтому любой флуориметр можно использовать в качестве нефелометра. Многие серийные флуориметры снабжены специальными приспособлениями для нефелометрических измерений. Недостатком методов, основанных на измерении рассеяния света, является то, что на измеряемый сигнал сильно влияет размер частиц. Поэтому необходимо строгое соблюдение идентичности условий построения градуировочного графика и анализа исследуемого раствора. Можно сказать, что и нефелометрия, и турбидиметрия могут быть полезными для селективных аналитических реакций, в результате которых образуется твердое соединение [4–7, 20].

Иммунохимические методы основаны на иммуноингибировании латексной агглютинации с моноклональными антителами к $HbA1c$. Наборы представляют собой жидкие, полностью готовые к использованию, стабильные реагенты. В основе определения антител наборами реагентов лежит взаимодействие антител с антигенами с образованием иммунокомплексов, приводящее к изменению оптической плотности реакционной среды [7]. Наборы легко адаптируются на все автоматические и полуавтоматические анализаторы [14, 20]. В 2001 году Международная федерация клинической химии (IFCC), в составе рабочей группы по стандартизации лабораторных методов определения $HbA1c$, утвердила ВЭЖХ и КЭ как референсные методы [34]. В 2011 году отмечается 110 лет открытия метода жидкостной хроматографии русским ученым Михаилом Семеновичем Цветом [24]. В 1901 г. он предложил использовать для разделения растительных пигментов (хлорофилла) на их составляющие колонки, заполненные порошком мела. Интересно отметить, что работал М. С. Цвет в Санкт-Петербурге, где ученый заведовал ботаническим отделом биологической лаборатории, руководимой Петром Францевичем Лесгафтом, и преподавал ботанику на курсах, организованных при лаборатории [19].

ВЭЖХ позволяет исходную изучаемую сложную смесь разделять на относительно простые составляющие, которые в дальнейшем уже легче подвергнуть анализу обычными физико-химическими методами или специальными методами, созданными для хроматографии.

В настоящее время отличительной особенностью ВЭЖХ является использование высокого давления (до 400 бар) и мелкозернистых сорбентов (обычно 3–5 мкм, сейчас до 1,8 мкм). Это позволяет разделять сложные смеси веществ быстро и полно (среднее время анализа от 3 до 30 мин).

По механизму разделения анализируемых или разделяемых веществ ВЭЖХ делится на адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, лигандообменную.

Процесс анализа методом ВЭЖХ делится на 2 этапа: разделение пробы на составляющие компоненты и детектирование и измерение содержания каждого компонента.

Задача **разделения** решается при помощи трубки, заполненной сорбентом (хроматографическая колонка). Через нее прокачивается жидкость (элюент) определенного состава с постоянной скоростью. В процессе исследования в поток элюента вводят точно отмеренную дозу изучаемого материала (проба). Так как состав пробы неоднороден, то и скорость продвижения составных частей не одинакова. В итоге на выходе к определяющему детектору составные части проб появляются в разное время, что и используется для их изучения. Следовательно, подбирая различные колонки, можно управлять степенью разделения изучаемого материала. Задачей детектора является количественное измерение выявленных составляющих исходной пробы на выходе из трубки по величине аналитического сигнала. В хроматографической системе могут использоваться различные типы детекторов [2].

Преимущества ВЭЖХ:

– ВЭЖХ с электрохимическим детектированием позволяет находить и идентифицировать на уровне следовых количеств биологически активные соединения в биологических жидкостях, определять биогенные амины, лекарственные препараты в биологических жидкостях, проводить анализ фенолов, витаминов, выполнять ионный и аминокислотный анализы;

– За счет уменьшения внутреннего диаметра ЖХ-колонок достигается существенное преимущество, особенно когда в распоряжении оператора **минимальные объемы проб**, а анализируемые вещества находятся в **исчезающе малых количествах**. Исследователи, работающие в области молекулярной биологии, протеомики, а также криминалисты и судебно-медицинские эксперты часто имеют дело с очень ограниченным количеством исследуемого материала. В таких случаях основными качествами ЖХ-системы являются **высокие чувствительность и разрешение**;

– **ВЭЖХ позволяет решить любые исследовательские задачи** за счет возможности применения колонок различной длины. Так, применение колонок малой длины (15–50 мм) с высокодисперсными сорбентами (1,8 мкм) дает возможность проводить анализы при более высокой температуре и большем рабочем давлении, что обеспечивает более высокую скорость сбора данных, а также успешное внедрение методов параллельной регенерации колонок в процессе анализа (новая область скоростной жидкостной хроматографии – RRLC). Это позволило сократить время единичного анализа

с десятков минут до одной-двух минут. В то же время применение длинных колонок (50–300 мм) с сорбентами 1,8 мкм дало возможность существенно (более чем на 60%) увеличить хроматографическое разрешение.

Недостатки ВЭЖХ:

- требует больших финансовых возможностей;
- не всегда применим для массовых скрининговых исследований.

Известно, что в крови человека наряду с основной фракцией гемоглобина (HbA) содержится незначительное количество других фракций, названных «минорными»: HbA1a (с фруктозой), HbA1b (с глюкозой-6-фосфатом), HbA1c (образуется при участии глюкозы). У здоровых взрослых людей на долю HbA приходится 90%, HbA1a – 1,6%; HbA1b – 0,8%, **HbA1c – 3,6%**; HbA2 – 2,5% и HbF – 0,5% [9]. Однако только концентрация **HbA1c** прямо пропорциональна средней концентрации глюкозы в крови. У здоровых людей концентрация HbA1c в крови составляет от 4 до 6%, у больных СД его уровень в 2–3 раза выше (в зависимости от степени гипергликемии). Образовавшийся HbA1c аккумулируется внутри эритроцитов и сохраняется в течение всего срока жизни эритроцита. Полупериод циркуляции эритроцита в кровяном русле составляет 60 суток, таким образом, концентрация HbA1c отражает уровень гликемии пациента за 60–90 дней до исследования [25, 29]. Огромное число исследований с использованием традиционных методов измерения содержания глюкозы подтвердило взаимосвязь HbA1c и уровня гликемии пациента [25, 30, 31, 37, 38]. Результаты исследований, проведенных ДССТ в 1990-х годах, послужили основанием для подтверждения гипотезы о том, что уровень HbA1c отражает уровень глюкозы в крови и является эффективным критерием при мониторинге больных СД [30, 36–38].

В методе **микроколоночной хроматографии** используется цельная стабилизированная кровь. Гемолизат цельной крови, нанесенный на хроматографическую микроколону, элюируется фосфатным буфером с низкой ионной силой. При этом HbA1c задерживается катионообменной смолой, а HbA1a, HbA1b и липиды вымываются. Последующее элюирование буфером с более высокой ионной силой позволяет собрать фракцию, содержащую HbA1c, и определить ее оптическую плотность. Измерение оптической плотности неэлюированного гемолизата, величина которой соответствует общей концентрации гемоглобина, позволяет рассчитать уровень HbA1c в процентах от общей концентрации гемоглобина [7].

Метод определения содержания HbA1c основан на аффинной хроматографии. Заполняющий микроколону сорбент обеспечивает на первой стадии специфическое связывание HbA1c (фракция Б) и его отделение от негликозилированной фракции (фракция А). На второй стадии происходит полное вытеснение гликозилированной фракции за счет вымывания из сорбента растворителем.



Рис. 1. Схема капиллярного электрофореза

По измеренным оптическим плотностям обеих фракций при длине волны 414 нм можно вычислить содержание ГГ [HbA1c] в анализируемом образце крови:

$$[HbA1c] = \frac{A_B}{A_B + 2,04A_A} \cdot 100\%$$

где A_A — оптическая плотность фракции А; A_B — оптическая плотность фракции Б; 2,04 — коэффициент пересчета, зависящий от объема фракций А и Б [14].

Иммунологические методы основаны на иммунохимических реакциях и в дальнейшем анализируются иммунотурбидиметрическим либо иммуноколориметрическим методом. Наборы представляют собой жидкие, полностью готовые к использованию, стабильные реагенты. В основе определения HbA1c наборами реагентов лежит взаимодействие антител с антигенами с образованием иммунокомплексов, приводящее к изменению

оптической плотности реакционной среды [7]. Принцип метода следующий.

К образцу крови добавляют реагент буфер/антитела, при этом HbA1c в образце реагирует с анти-HbA1 антителами и формирует растворимый комплекс антиген-антитело. Специфические антитела HbA1c присутствуют только на молекуле HbA1, поэтому образование комплекса не происходит. При добавлении буфер/полигаптена запускается реакция взаимодействия полигаптены с избытком анти-HbA1c антител с формированием нерастворимого комплекса антител-полигаптен, который может быть измерен турбидиметрически. **Наборы легко адаптируются на все автоматические и полуавтоматические анализаторы [20].**

Капиллярный электрофорез, известный также как капиллярный зональный электрофорез (англ. CZE), используется для разделения ионов по заряду. В случае

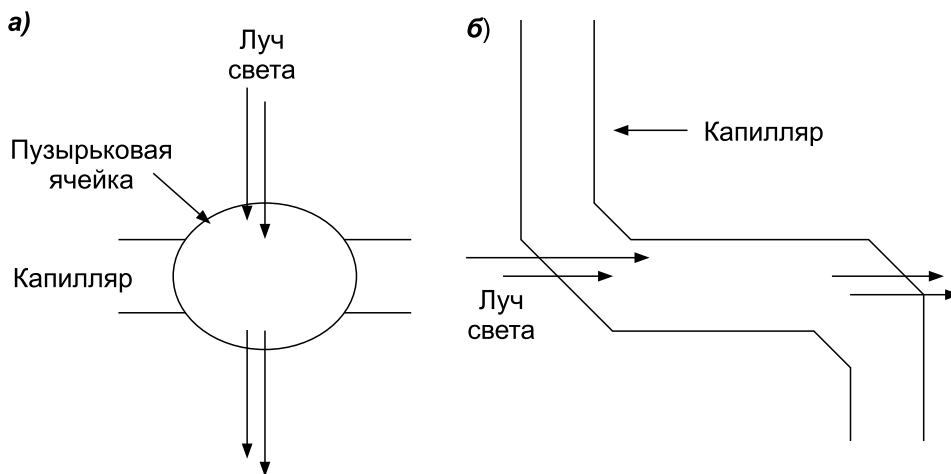


Рис. 2. Разновидности капилляров: а) пузырьковый, б) с дополнительным изгибом



Рис. 3. Движение заряженных частиц в электроосмотическом потоке

обычного электрофореза заряженные молекулы перемещаются в проводящей жидкости под действием электрического поля. В 1960-х годах была предложена методика капиллярного электрофореза для разделения молекул по заряду и размеру в тонком капилляре, заполненном электролитом.

Оборудование для проведения капиллярного электрофореза состоит из емкости для образца, стартового и конечного флаконов, капилляра, электродов, источника питания, детектора и устройства анализа данных. Все емкости заполнены водным буферным раствором. Для нанесения образца конец капилляра опускают во флакон с образцом и затем перемещают в стартовый флакон. Перемещение анализируемых веществ осуществляется под действием электрического поля, которое возникает между стартовым и конечным флаконами. Все ионы передвигаются по капилляру в одном направлении под действием электроосмотического тока. Анализируемые вещества разделяются по электрофоретической подвижности и детектируются около конца капилляра (рис. 1) [40].

После разделения молекул при капиллярном электрофорезе их подсчет может осуществляться различными устройствами. Чаще используют приборы, измеряющие поглощения в области ультрафиолетовых лучей или в области видимого света. В качестве ячейки используют участок капилляра. Длина пути проходящего света при капиллярном электрофорезе составляет порядка 50 микрометров, что намного меньше, чем в случае обычных ультрафиолетовых ячеек, в которых длина пути света порядка 1 сантиметра.

В соответствии с законом Бера–Ламберта, чувствительность детектора пропорциональна длине пути, по которому свет проходит через ячейку. Для увеличения чувствительности удлиняют путь, по которому проходит свет, однако при увеличении размеров ячейки снижается разрешение. Поэтому иногда капиллярная трубка может быть расширена в месте детекции (такую разновидность называют пузырьковой ячейкой), либо увеличивают путь проходящего света за счет добавления дополнительного капилляра (рис. 2). К сожалению, оба этих метода снижают эффективность разделения [40].

Детекция путем флуоресценции может быть использована при КЭ образцов, имеющих естественную флуо-

ресценцию, или химически модифицированных образцов с введенной флуоресцентной меткой. Такой способ детекции обеспечивает высокую чувствительность, однако не может быть использован для определения нефлуоресцирующих образцов. Также используют детекцию флуоресценции, вызванную лазером, такие системы капиллярного электрофореза могут детектировать в пределах от 10–18 до 10–21 моль.

Для того, чтобы отличить сходные образцы, системы разделения КЭ могут быть напрямую связаны с масс-спектрометрами. В большинстве таких систем конец капилляра помещают в прибор для электроаэрозольной ионизации. Ионизированные частицы далее анализируют масс-спектрометрией [40].

Молекулы разделяют капиллярным электрофорезом из-за отличий в подвижности в приложенном электрическом поле. Так как электрическое поле действует лишь на заряженные молекулы, незаряженные молекулы слабо разделяются КЭ (**недостаток метода**).

Скорость перемещения анализируемых молекул при КЭ зависит от величины электроосмотического потока в буфере. Отличающиеся электрофоретическими подвижностями, молекулы двигаются к противоположно заряженному электроду [40]. Отрицательно заряженные частицы двигаются к положительно заряженному аноду, положительно заряженные — к катоду в направлении электроосмотического потока (рис. 3).

Ввиду того, что электроосмотический поток буферного раствора обычно больше, чем электрофоретический поток анализируемых веществ, все анализируемые молекулы перемещаются с буферным раствором к катоду. Отрицательно заряженные молекулы дольше задерживаются в капилляре, ввиду противоречий в их электрофоретических подвижностях. Порядок перемещения заряженных молекул представлен на рисунке 3: небольшие катионы перемещаются быстро, малые многократно заряженные анионы сильно задерживаются [40].

Эффективность разделения путем капиллярного электрофореза, как правило, значительно выше, чем эффективность других методов разделения, например, жидкостная хроматография высокого давления. В отличие от ЖХВД, в случае капиллярного электрофореза не происходит перенос масс между фазами [40]. Профиль потока в случае систем электроосмотического потока яв-

ляется плоским, в отличие от ламинарного профиля хроматографических колонок, в которых разделение происходит под давлением (рис. 4). В результате этого при электроосмотическом разделении не происходит расширения полос, как при хроматографии [40].

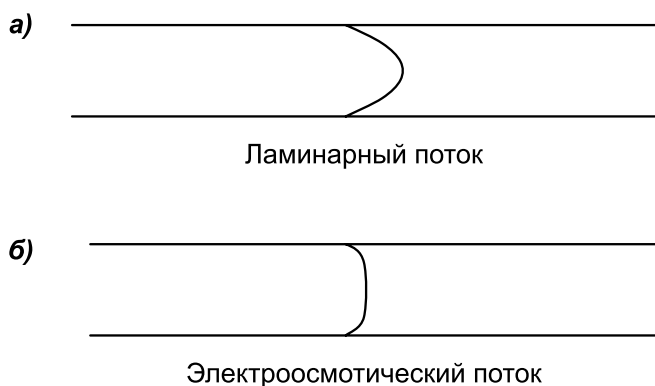


Рис. 4. Профиль потока: а) ламинарный, б) электроосмотический

Разделение при помощи капиллярного электрофореза основано на различиях в электрофоретических подвижностях разделяемых молекул. Однако некоторые классы молекул не могут быть разделены, так как являются незаряженными или незначительно отличаются по электрофоретической подвижности. Добавление поверхностно-активных веществ облегчает разделение незаряженных молекул. Заряженные полимеры, например, ДНК, могут быть разделены в капиллярах, заполненных гелем; гель сильнее замедляет более длинные молекулы, чем более короткие. Такой вариант капиллярного электрофореза называют капиллярным гелелектрофорезом.

КЭ имеет ряд преимуществ по сравнению с ВЭЖХ:

- высокая **эффективность** разделения, обусловленная **плоским профилем** электроосмотического потока (число теоретических тарелок достигает 1 000 000);
- **экономичность**, т. к. практически не требуется применение дорогостоящих высококачественных растворителей (ацетонитрил, метанол, гексан) и малый расход реактивов; отсутствие дорогостоящих хроматографических колонок;
- отсутствие дорогостоящих насосов высокого давления, необходимых для ВЭЖХ;
- объемы пробы могут составлять всего лишь 100 мкл,
- простота аппаратного оформления;
- отсутствие твердого сорбента в капилляре исключает возможность его «старения», химической и физической деструкции и любого неспецифического связывания с ним компонентов пробы;
- **быстрота** проведения анализа (экспресс-диагностика). Эти преимущества обуславливают широкое использование КЭ для **анализа объектов**

окружающей среды. Наиболее часто КЭ используют для определения катионов и анионов в водах. Следует отметить, что разделение одной и той же смеси анионов КЭ занимает существенно меньшее время, чем ВЭЖХ.

Недостатки метода КЭ:

- не все классы молекул могут быть разделены этим методом, так как являются незаряженными или незначительно отличаются по электрофоретической подвижности.
- используемая для детекции флуоресценция применима только для веществ с естественной флуоресценцией, либо вынуждает дополнительно выполнять химическую модификацию, при которой вводят флуоресцентные метки. Такой способ детекции обеспечивает высокую чувствительность, однако не может быть использован для определения нефлуоресцирующих образцов.

Сравним КЭ с другими методами

Метод **радиальной иммунодиффузии** является наиболее простым и относительно недорогим. Однако он не получил широкого распространения в связи с длительным инкубационным периодом, что исключает его использование для диагностики неотложных состояний.

Радиоиммунный метод является чувствительным и относительно недорогим. Но реактивы имеют ограниченный срок годности из-за относительно короткого периода полураспада изотопа йода, метод в настоящее время используется редко.

Иммунотурбидиметрия представляет собой один из вариантов фотометрического анализа, основу которого составляет определение величины светопоглощения взвешенными в растворе частицами.

В настоящее время многие зарубежные производители выпускают наборы реактивов, адаптированные к современным высокопроизводительным биохимическим анализаторам. Кроме того, на рынке представлены небольшие по размерам и удобные в использовании анализаторы, приспособленные для определения различных индивидуальных белков с помощью иммунотурбидиметрии. Для повышения чувствительности метода используют антитела, связанные с частицами латекса (latex enhanced immunoturbidimetry). Все перечисленные выше методы обладают высокой чувствительностью и специфичностью, выбор конкретного метода определяется аналитическими и, в большей мере, **финансовыми возможностями лаборатории**. Широкому использованию **количественных** методов определения отдельных белков препятствует их **высокая стоимость**.

Более простые в исполнении скрининговые тесты, относящиеся к разряду **качественных** или **полуколичественных**. Эти тесты основаны на визуальной оценке характера агглютинации частиц латекса, покрытых антителами против определяемого белка. В основу метода

положена реакция агглютинации, которая запускается формированием множества связей между антителами и антигенами с несколькими антигенными детерминантами. Это позволяет молекулам антител связаться не только с несколькими связывающими участками на отдельной частице, но и с такими же участками на соседних частицах. При этом образуется сложная решетчатая трехмерная структура с высокой молекулярной массой, что приводит к образованию крупных комплексов и выпадению их в осадок в виде хлопьев. К факторам, влияющим на скорость агглютинации, а значит и на точность этого метода, относят: размер частиц, тип антител, концентрацию электролитов, вязкость среды, концентрацию реагентов, локализацию и концентрацию антигенных детерминант, время и температуру инкубации. Поэтому нужно иметь в виду, что используемые в реакциях латекс-агглютинации реагенты менее стан-

дартизированы, чем реагенты, используемые в современных «закрытых» аналитических системах.

В настоящее время не существует единой и согласованной стандартизации методов определения HbA1c. В 2001 году Международной федерацией клинической химии (IFCC) рекомендован референс-метод по определению HbA1c (HPLC) [13, 27, 34, 36]. Поэтому актуальным остается вопрос о разработке альтернативных, принципиально новых методов определения уровня HbA1c [33, 42]. В связи с этим перспективным является метод изоэлектрического фокусирования в капиллярах с последующей фотоколориметрией (ИЭФ+ФК) [11]. Преимуществом данного метода является возможность использования определения уровня HbA1c не только в качестве показателя нарушенного обмена глюкозы, но и как маркера патологических изменений при критических состояниях в реаниматологии, для про-

Таблица 1. Результаты сравнения методов

Название метода	Недостатки	Преимущества
ВЭЖХ	<ul style="list-style-type: none"> – требует больших финансовых возможностей – не всегда применим для массовых скрининговых исследований 	<ul style="list-style-type: none"> – позволяет находить и идентифицировать вещества <i>на уровне следовых количеств</i> ⇒ сверхчувствительный метод – высокоточный – информативный
КЭ	<ul style="list-style-type: none"> – незаряженные молекулы не могут разделяться капиллярным электрофорезом – используемая для детекции флуоресценция применима только для веществ с естественной флуоресценцией, либо вынуждает дополнительно выполнять химическую модификацию, при которой вводят флуоресцентные метки – не может быть использован для определения нефлуоресцирующих образцов 	<ul style="list-style-type: none"> – высокая эффективность разделения, за счет плоского профиля электроосмотического потока (точный) – экономичность и малый расход реактивов – быстрота проведения анализа (экспресс-диагностика)
Радиальная иммунодиффузия	<ul style="list-style-type: none"> – длительный инкубационный период – невозможность использования для диагностики неотложных состояний 	<ul style="list-style-type: none"> – простой – относительно недорогой
Радиоиммунный метод	<ul style="list-style-type: none"> – реактивы имеют ограниченный срок годности из-за относительно короткого периода полураспада изотопа йода 	<ul style="list-style-type: none"> – чувствительный – относительно недорогой
Иммунотурбидиметрия	<ul style="list-style-type: none"> – высокая стоимость – применимы специальные тест-полоски – при наличии МАУ необходимо подтвердить с помощью количественных или полуколичественных методов определения экскреции альбуминов с мочой 	<ul style="list-style-type: none"> – применимы для скрининговых, малобюджетных исследований
Иммунохимический метод	<ul style="list-style-type: none"> – проводятся скрининговые, малобюджетные исследования 	<ul style="list-style-type: none"> – наличие фабричной калибровки – количественное определение микроальбуминурии в моче – экспресс-метод – не нуждается в дополнительном оборудовании – высокая точность – чувствительность и специфичность – минимальное обслуживание

гнозирования протеинурии, хронической почечной недостаточности при различных нефропатиях, а также в качестве дополнительного критерия адекватности программного гемодиализа, для оценки воспалительного процесса в детской ревматологии [12].

Ранняя диагностика ДН, основанная на определении **МАУ**, проводится следующими методиками.

Основным в клинике методом определения МАУ является **иммунотурбидиметрический** (альбумин).

При **скрининге** для выявления микроальбуминурии допустимо использовать специальные тест-полоски. Но при положительном результате этих тест-полосок наличие МАУ необходимо в последующем подтвердить с помощью **количественных** или **полуколичественных** методов определения экскреции альбуминов с мочой.

Для **полуколичественной** экспресс-оценки степени МАУ применяют индикаторные тест-полоски. Обычно визуальная калибровка цветовой гаммы предполагает следующие варианты определения альбуминурии тест-полосками: (1) «альбумин в моче не определяется»; (2) «следы альбуминов» (около 150 мг/л); (3) 300 мг/л; (4) 1000 мг/л; (5) 2000 мг/л; (6) более 2000 мг/л. Микроальбуминурией считается уровень экскреции альбуминов с мочой не более 300 мг/л, а макроальбуминурией — не более 1000 мг/л. Чувствительность и специфичность таких тестов достигают 90%.

Для **количественной** оценки МАУ существуют следующие два основных метода:

1) прямой иммунотурбидиметрический;

2) косвенный, основанный на существовании сильной корреляции между содержанием в моче креатинина и альбумина;

3) также для количественной оценки МАУ применяют иммунохимический метод с помощью различных систем.

Прямой иммунотурбидиметрический метод, основанный на том, что человеческий альбумин можно определить по реакции со специфическим антителом, при которой в присутствии этиленгликоля происходит быстрая преципитация иммунокомплексов; если имеется значительный избыток антитела, преципитат вызывает турбидность (поглощение света), степень которой зависит от концентрации альбумина в исследуемом образце (турбидность определяют фотометрически при длине световой волны 340 нм). Содержание альбумина в исследуемом образце определяют по калибровочной кривой, которую строят по результатам определения концентрации альбумина с применением набора калибраторов. Калибровочной кривой пользуются либо непосредственно графически, либо с помощью специальной компьютерной программы. Содержание альбумина, определенное во второй после утренней 3-часовой порции мочи, умножают на 8 для получения содержания альбумина в суточной моче. Норма экскреции альбумина при использовании данного метода составляет 25 мг/сут. Минимальная определяемая концентрация альбумина равна 5 мг/л.

Концентрацию альбумина в моче по содержанию в ней креатинина определяют при невозможности использования иммунотурбидиметрического метода. Уровень креатинина в моче определяют известными методами. Содержание альбумина рассчитывают по формуле: $МАУа = (Са/Ск \times 5,65)/1000$, где МАУа — экскреция альбумина (мкг на 1 мг креатинина), Са — концентрация альбумина (мг/л), Ск — концентрация креатинина (мкмоль/л), 5,65 и 1000 — переводные коэффициенты (норма — до 40 мкг/мг). Чувствительность и специфичность иммунотурбидиметрического метода приближаются к 100%; соответствующие характеристики креатининового метода лишь немногим ниже.

Имунохимический метод основан на иммунохимической реакции, использующей специфические антитела. Комплекс антиген-антитело создает осадок, который улавливается фотометрически в диапазоне 610 нм. Такие системы состоят из фотометра, трансформатора и микрокуветы. Микрокувета содержит высушенный замораживанием реактив, необходимый для анализа. Забор мочи в микрокувету происходит капиллярным действием. Преимуществом таких систем является наличие **фабричной калибровки, количественное** определение микроальбуминурии в моче, быстрое (в пределах 90 секунд) получение результатов, что позволяет ее считать экспресс-методом, она не нуждается в любом дополнительном оборудовании, показывает **высокую точность, чувствительность и специфичность** и требует **минимального обслуживания** [9, 10, 15, 23].

Выводы

Проведенный нами анализ применяемых методов контроля СД позволил сделать следующие выводы:

1) референсными, предпочтительными методами для определения HbA1c являются метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и метод капиллярного электрофореза;

2) основным методом определения микроальбумина в моче является иммунохимический метод, он не нуждается в любом дополнительном оборудовании, показывает высокую точность, чувствительность и специфичность и требует минимального обслуживания;

3) выбор метода зависит от поставленной перед исследователем задачи:

- если необходим высокоточный, информативный метод, выбор будет в пользу ВЭЖХ,
- если необходима быстрота и точность, то, скорее всего, будет применен метод капиллярного электрофореза,
- а если проводятся скрининговые, малобюджетные исследования, то применяться, скорее всего, будут портативные иммунохимические методы.

4) перспективным является метод изоэлектрического фокусирования в капиллярах с последующей фотокориметрией (ИЭФ + ФК).

Литература и использованные источники

1. Всемирная организация здравоохранения, шестьдесят первая сессия Всемирной ассамблеи здравоохранения, Женева, 18 января 2007 года, 61/225 (WHA42/1989/REC/1).
2. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. Под ред. А. И. Карпищенко. 1–2 т. СПб., 1988.
3. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М. Лечение сахарного диабета и его осложнений: учеб. пособие. М.: Медицина, 2005: 512.
4. Балаболкин М. И. Диабетология. М.: Медицина, 2000; 420–439.
5. Берштейн И. Я., Каминский Ю. Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии. Л.: Химия, 1986.
6. Бутолин Е. Г., Иванов В. Г. Клиническая информативность показателей биологических жидкостей организма (Справочное пособие). Ижевск: Экспертиза, 1998.
7. Васильев В. П. Аналитическая химия. В 2 ч. Ч. 2. Физико-химические методы анализа: учеб. для химико-технол. спец. вузов. М.: Высш. шк., 1989: 384.
8. Дедов И. И., Шестакова М. В., Максимова М. А. Федеральная целевая программа «Сахарный диабет». М., 2002: 84.
9. Клиническая лабораторная аналитика. Под редакцией В. В. Миньшикова. Том III. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. М.: Лабпресс, 2000.
10. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь, 1982.
11. Королев В. А. Метод изоэлектрического фокусирования в капиллярах для определения гликозилированного гемоглобина у больных сахарным диабетом. Клиническая физиология кровообращения. 2006; 3: 74–79.
12. Королев В. А., Белокурченко В. П., Глазунов С. Е., Телесюк К. П. Метод изоэлектрического фокусирования в капиллярах при определении гликированного гемоглобина. Архив клинической и экспериментальной медицины. 2008; 17 (1): 28–32.
13. Лихоносова А. П., Лихоносов Н. П., Кузнецова О. Г. Анализ методов определения уровня гликозилированного гемоглобина в лечебно-профилактических учреждениях города Санкт-Петербурга. Международный эндокринологический журнал. 2010; 6 (30): 23–32.
14. Медицинская биохимия: лабораторный практикум (для студентов III курса специальности «Медицинская физика»)/сост.: Е. В. Бескровная, Е. Ю. Мосур, В. И. Ямковой; под ред. проф. Н. А. Семиколоновой. Омск: Изд-во ОмГУ, 2005: 76.
15. Морозова В. Т., Миронова И. И., Марцишевская Р. Л. Исследование мочи. М.: РМАПО, 1996.
16. Остапенко В. А., Фирстова Л. П., Елисева И. П. и др. Оптимизация определения стабильной фракции гликозилированного гемоглобина HbA_{1c} методом индексации суммарной фракции гликозилированного гемоглобина HbA₁. Фундаментальные исследования. 2008: 6.
17. Питерс-Хармел Э., Матур Р. Сахарный диабет. Диагностика и лечение. Практика. 2008.
18. Попова Ю. С. Сахарный диабет. Крылов, 2008.
19. Сайт НИИ СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Режим доступа: <http://www.spb-gmu.ru/content/view/666/377/>
20. Сакодынский К. И. и др. Аналитическая хроматография. М.: Химия, 1993.
21. Санкт-Петербург. Регионы России. Основные социально-экономические показатели городов. 2007: 140–141.
22. Сахарный диабет в России: проблемы и решения. Издание Международного форума «Объединиться для борьбы с диабетом» 21.11.2008.
23. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. Под ред. Е. А. Кост. М.: Медицина, 1975.
24. Цвет М. С. Физико-химическое строение хлорофиллового зерна. Экспериментальное и критическое исследование. Труды Казанского общества естествоиспытателей. 1901; 35 (3): 268.
25. ADA. Implications of the United Kingdom Prospective Diabetes Study (Position Statement). Diabetes Care. 1999; I: 27–31.
26. Anand S., Razak F., Vuksan V. et al. Diagnostic Strategies to Detect Glucose Intolerance in a Multiethnic Population. Diabetes Care February. 2003; 26: 290–296.
27. Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A_{1c} Measurement. Consensus Committee. Diabetes Care. 2007; 30 (9): 2399–2400.
28. Sacks D. B., Bruns D. E., Goldstein D. E. et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Clinical Chemistry. 2002; 48: 436–472.
29. DCCT Research Group. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Engl. J. Med. 1993; 329: 977–986.
30. Goldstein D. E., Little R. R. Bringing Order to Chaos: Standardizing the Hemoglobin A_{1c} Assay. Contemp. Int. Med. 1997; 9 (5): 27–32.
31. Gonen B. A., Rubinstein A. H., Rochman H. et al. Hemoglobin A₁: An Indicator of the Metabolic Control of Diabetic Patients. The Lancet. 1977; Oct 8; 2 (804): 734–737.
32. Harris M., Zimmet P. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. In: Alberti K., Zimmet P., Defronzo R., editors. International Textbook of Diabetes Mellitus. Second Edition. Chichester: John Wiley and Sons Ltd. 1997: 9–23.
33. Jeffcoate S. L. Diabetes control and complications: the role of glycated haemoglobin, 25 years on. Diabet. Med. 2004; 21 (7): 657–665.
34. Jeppsson J.-O. et al. Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA_{1c} in Human Blood. Clin. Chem. Lab. Med. 2002; 40: 78–89.
35. Koenig R. J., Peterson C. M., Kilo C. et al. Hemoglobin A_{1c} as an Indicator of the Degree of Glucose Intolerance in Diabetes. Diabetes. 1976; 25 (3): 230–232.
36. Little R. R., England J. D., Wiedmeyer H. M. et al. Interlaboratory Comparison of Glycated Hemoglobin Results: College of American Pathologists (CAP) Survey Data. Clin. Chem. 1991; 37: 1725–1729.
37. Little R. R., England J. D., Wiedmeyer H. M. et al. Interlaboratory Standardization of Glycated Hemoglobin Determinations. Clin. Chem. 1986; 32: 358–360.
38. Little R. R., England J. D., Wiedmeyer H. M. et al. Interlaboratory Standardization of Measurements of Glycohemoglobin. Clin. Chem. 1992; 38: 2472–2478.
39. Nakanishi S., Yamada M., Hattori N., Suzuki G. Relationship between HbA_{(1)c} and mortality in a Japanese population. Diabetologia. 2005; 48 (2): 230–234.
40. Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S.R. Principles of Instrumental Analysis. 6th ed. Thomson Brooks/Cole Publishing: Belmont, CA, 2007.
41. Verge C. F., Gianani R., Kawasaki E. et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. Diabetes. 1996; 45: 926–933.
42. Jager A. V., Tavares M. F. M. Novel approach for the analysis of glycated hemoglobin using capillary focusing with chemical mobilization. J. Chromatogr. 2003; 785 (2): 285–292.
43. Wenzlau J. M., Juhl K., Yu L. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007; 104 (43): 17040–17045.

**Главным специалистам по клинической лабораторной диагностике
местных органов управления здравоохранением,
председателям местных отделений Научно-практического общества
специалистов лабораторной медицины,
заведующим кафедрами клинической лабораторной диагностики**

Уважаемые коллеги!

В условиях модернизации здравоохранения нашей страны особенно важно обеспечить высокое качество и надежность лабораторной информации, предоставляемой клинико-диагностическими лабораториями. Общемировая практика свидетельствует, что эффективным средством совершенствования деятельности лабораторий является следование требованиям стандартизации, как в отношении общей организации деятельности лабораторий, так и для обеспечения повседневной правильности и прецизионности лабораторных результатов. На протяжении последних лет была проведена значительная работа по формированию отечественной нормативной базы для лабораторной медицины. Введены в действие 35 Национальных стандартов Российской Федерации, регламентирующих основные стороны деятельности лабораторий, их отношений с клиническим персоналом и пациентами, с поставщиками средств лабораторного анализа, принят комплекс требований к изготовителям медицинских изделий для лабораторной диагностики. В интересах совершенствования лабораторного обеспечения медицинской помощи населению во всех регионах страны целесообразно оценить степень использования созданных нормативных положений на практике.

Исходя из этих принципов, Правление НПО СЛМ предлагает в течение 2012 года провести повсеместный опрос лабораторных специалистов по проблемам применения Национальных стандартов Российской Федерации в деятельности клинико-диагностических лабораторий учреждений здравоохранения.

Перечень вопросов прилагается:

1. Знакомы ли руководители и сотрудники лабораторий с действующими Национальными стандартами в области лабораторной медицины?
2. Какими способами получения текстов Национальных стандартов пользуются лаборатории (приобретение официальных изданий в Стандартинформе, Интернет, периодическая литература)?
3. Применяются ли в организации и повседневной деятельности клинико-диагностических лабораторий положения следующих стандартов: ГОСТ Р ИСО 15189; ГОСТ Р 52905 (ИСО 15190); ГОСТ Р ИСО/ТО 22869; ГОСТ Р ИСО 22 870; ГОСТ Р 53022, части 2, 3 и 4; ГОСТ Р 53079, части 1, 2.3 и 4; ГОСТ Р 53133, части 1, 2, 4?
4. С какими трудностями сталкиваются руководители лабораторий при применении Национальных стандартов в области лабораторной медицины в своих учреждениях?
5. Существует ли должное взаимодействие лаборатории с клиническим персоналом на преаналитическом этапе лабораторных исследований?
6. Применяются ли в лабораториях стандартизованные аналитические технологии лабораторных исследований, рекомендованные НПО СЛМ?
7. Проводится ли анализ причин несоответствия результатов исследований одних и тех же анализов, выполняемых с применением различных методик, тест-систем различных изготовителей?
8. Возникают ли проблемы качества исследований, связанные с калибраторами?
9. Имеются ли трудности с приобретением реагентов необходимого состава и качества через систему закупок по тендерам?
10. Имеются ли трудности в получении информации от фирм-поставщиков тест-систем о метрологических свойствах поставляемых ими средств лабораторного анализа?

Правление НПО СЛМ просит в течение 1-го квартала 2012 г. распространить предлагаемый вопросник на заседаниях местных отделений общества, совещаниях заведующих лабораториями в органах управления здравоохранением, на занятиях с курсантами на кафедрах клинической лабораторной диагностики.

В течение 2-го квартала 2012 г. Правление ожидает с мест обобщенные данные по регионам, предложения по решению выявленных проблем и устранению недостатков.

В 4-м квартале 2012 г. планируется проведение конференции (желательно с участием главных специалистов региональных органов управления здравоохранением) для определения необходимых мер по распространению применения стандартов в практике клинико-диагностических лабораторий страны.

Председатель Правления
Научно-практического общества
специалистов лабораторной медицины,
профессор

В.В. Меньшиков

ИНФОРМАЦИОННОЕ СООБЩЕНИЕ

Уважаемые коллеги!

Правление Научно-практического общества специалистов лабораторной медицины приглашает Вас принять участие в работе XVI Форума «Национальные дни лабораторной медицины России-2012».

В программе Форума:

- **Общероссийская научно-практическая конференция «РЕАЛЬНЫЕ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ УСЛУГИ: СТЕПЕНЬ СООТВЕТСТВИЯ СОВРЕМЕННЫМ СТАНДАРТАМ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ, КАЧЕСТВО, СЕБЕСТОИМОСТЬ И ЦЕНА»**
- **Специализированная выставка «ИНТЕРЛАБДИАГНОСТИКА-2012»**

Мероприятия состоятся 2–4 октября 2012 года

В рамках конференции планируется рассмотрение:

- степени соответствия лабораторных услуг принятым порядкам оказания медицинской помощи при основных формах патологии и современным стандартам лабораторной медицины;
- реального содержания и качества лабораторного обеспечения различных форм оказания медицинской помощи — амбулаторной, стационарной, высокотехнологичной — с использованием локального, централизованного и мобильного выполнения лабораторных исследований;
- оценки себестоимости исследований и применяемых на практике тарифов на лабораторные услуги.

К участию в работе Форума приглашаются специалисты всех клинических дисциплин и лабораторной медицины, работники клиничко-диагностических лабораторий всех форм собственности, организаторы здравоохранения и сотрудники страховых организаций, преподаватели образовательных учреждений высшего, дополнительного и среднего профессионального образования, сотрудники организаций медицинской промышленности и дистрибьюторы средств лабораторного анализа.

Материалы конференции предполагается опубликовать в журнале «Клиническая лабораторная диагностика».

Тезисы предполагаемых выступлений, предложения по обсуждаемым на конференции проблемам необходимо направить в секретариат Правления Общества до 15 апреля 2012 г.

Требования к оформлению тезисов

1. Порядок оформления: первый абзац — инициалы и фамилии авторов; второй абзац — название работы; третий абзац — название организации(-ий), город.
2. Содержание тезисов должно соответствовать одной из указанных выше тем. Должны быть представлены четко сформулированные цель и задачи исследования, материал и использованные технологии, конкретные результаты наблюдений в абсолютных цифрах или в процентах, с применением общепринятых единиц величин, обобщенные клинические результаты, выводы и рекомендации. Принимаются только общепринятые аббревиатуры. Таблицы и рисунки не должны использоваться. Ссылки на подробное изложение в устном докладе, вместо приведения в тезисах конкретных данных, не рекомендуются.
3. Объем тезисов — 1 стр. формата А4 (210×297 мм), шрифт — размер 14 пт, обычный, Times New Roman, межстрочный интервал — полуторный. Тезисы должны быть представлены как на бумажном, так и на электронном носителе.
4. В приложении к тезисам следует указать:
 - одобрение содержания сообщения руководством организации или местным отделением Научно-

- практического общества специалистов лабораторной медицины;
- точный почтовый адрес, номер телефона, адрес эл. почты — для связи;
- намерение выступить с устным сообщением или только опубликовать тезисы;
- имя и отчество автора (одного из авторов), который будет выступать с докладом;
- потребность в заказе номера в гостинице, в случае личного участия.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Секретариат Правления Научного общества специалистов лабораторной медицины

119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, лаборатория проблем стандартизации клиничко-лабораторной диагностики
Тел./факс: (495) 622-9576, тел.: (499) 766-8774, (915) 403-8744
E-mail: menshikov@mma.ru
www.labmedicina.ru

Организация выставки

ООО «ММА-ЭКСПО»
Тел.: (925) 505-10-21, (926) 994-04-79
E-mail: mmaexpo@mail.ru, mmaexpo@yandex.ru
www.mma-expo.ru, mma-экспо.рф

ВОПРОСНИК

«Применение положений и требований Национальных стандартов Российской Федерации в клинико-диагностических лабораториях учреждений здравоохранения»

1. Знакомы ли руководители и сотрудники лабораторий с действующими Национальными стандартами в области лабораторной медицины?

2. Какими способами получения текстов Национальных стандартов пользуются лаборатории (приобретение официальных изданий в Стандартинформе, Интернет, периодическая литература)?

3. Применяются ли в организации и повседневной деятельности клинико-диагностических лабораторий положения следующих стандартов:

- ГОСТ Р ИСО 15189,
- ГОСТ Р 52905 (ИСО 15190),
- ГОСТ Р ИСО/ТО 22869,
- ГОСТ Р ИСО 22 870,
- ГОСТ Р 53022, части 2, 3 и 4,
- ГОСТ Р 53079, части 1, 2.3 и 4,
- ГОСТ Р 53133, части 1, 2, 4?

4. С какими трудностями сталкиваются руководители лабораторий при применении Национальных стандартов в области лабораторной медицины в своих учреждениях?

5. Существует ли должное взаимодействие лаборатории с клиническим персоналом на преаналитическом этапе лабораторных исследований?

6. Применяются ли в лабораториях стандартизованные аналитические технологии лабораторных исследований, рекомендованные НПО СЛМ?

7. Проводится ли анализ причин несоответствия результатов исследований одних и тех же анализов, выполняемых с применением различных методик, тест-систем различных изготовителей?

8. Возникают ли проблемы качества исследований, связанные с калибраторами?

9. Имеются ли трудности с приобретением реагентов необходимого состава и качества через систему закупок по тендерам?

10. Имеются ли трудности в получении информации от фирм-поставщиков тест-систем о метрологических свойствах поставляемых ими средств лабораторного анализа?

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова

Научно-образовательный Центр
«Институт лабораторной медицины»

Уважаемые коллеги!

Приглашаем принять участие в цикле тематического усовершенствования
«Управление качеством лабораторных исследований»

Цикл предназначен для сотрудников учреждений, которые хотят повысить свои конкурентные преимущества в системе госзаказа и на рынке лабораторных услуг. Продолжительность цикла ТУ — 144 ч. Сроки проведения — по мере формирования групп.

Основные вопросы:

1. Основы менеджмента качества в здравоохранении, общие вопросы управления качеством медицинских лабораторных услуг.
2. Потребности современной клиники в лабораторной диагностике в формате доказательной медицины.
3. Качество деятельности лабораторий глазами потребителей.
4. Система менеджмента качества и стандарты ГОСТ Р ИСО 9001-2008 и ГОСТ Р ИСО 15189-2009.
5. Роль лаборатории в обеспечении качества преаналитического этапа и исследований «в месте лечения».

6. Метрологические аспекты лабораторного исследования.
7. Особенности контроля качества отдельных лабораторных технологий.
8. Принцип Кларка при оценке рисков лабораторного исследования.
9. Системы внешней оценки качества. Межлабораторные сличения.
10. Информационные системы в лабораторной медицине.
11. Экономические аспекты деятельности клинико-диагностической лаборатории в формате ФЗ-94, ФЗ-83, аутсорсинг.

В рамках цикла планируется проведение научно-практической конференции «Современные методы диагностики “в месте лечения”».

Телефон для справок: (812) 233 97 26



Российское научное общество иммунологов

Санкт-Петербургский государственный университет им. акад. И.П. Павлова
Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины
Центр клинической лабораторной диагностики
Лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики

VII ВСЕРОССИЙСКАЯ ШКОЛА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

19–30 марта 2012 года, Санкт-Петербург

Дорогие коллеги!

Приглашаем вас принять участие в работе седьмой всероссийской школы
«Проточная цитометрия в клинической лабораторной диагностике».

Лекции и практические занятия организованы в форме повышения квалификации врачей клинической лабораторной диагностики, научных сотрудников, аспирантов, ординаторов и студентов.

Программа Школы:

- ✦ Лекции по базовым вопросам гемопоэза и иммунной системы, по диагностике и мониторингу отдельных нозологических форм онкогематологических заболеваний, количественному определению гемопоэтических стволовых клеток, по современным приложениям проточной цитометрии, включая аллергодиагностику и оценку средней интенсивности флуоресценции для выявления биологических особенностей клеток; по возможностям проточной цитометрии для клинической иммунологии в диагностической практике;
- ✦ Практика на проточных цитометрах и освоение программного обеспечения для различных приложений проточной цитометрии;
- ✦ Клинические разборы типичных и спорных случаев.

Место проведения: Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Центр лабораторной диагностики, кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики, корпус № 11, ул. Льва Толстого, 6/8, Санкт-Петербург.

ОРГКОМИТЕТ: Зуева Екатерина Евгеньевна, д. м. н., профессор, руководитель школы
Русанова Екатерина Борисовна, к. б. н.
Горчакова Маргарита Валерьевна
Слободнюк Константин Юрьевич

Телефоны: (812) 234-3407, (921) 866-6373, факс (812) 233-9726

E-mail: immunology.spbgmu@gmail.com

Полная информация размещена на сайте www.immunologica.ru

Мы надеемся увидеть Вас на занятиях Школы!
С уважением, Оргкомитет

Л. А. СОВЦОВ

Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере

Н. В. ЕРШОВА, В. А. ПОПОВА, Н. Е. СИМОНОВА

Фонд ТВН Санкт-Петербургского государственного политехнического университета

ПРОГРАММА

Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «УМНИК»

Вовлечение молодежи в научно-техническую деятельность — важнейшая задача современного этапа развития экономики. Утечке умов, как за рубежом, так и в иные отрасли экономики, необходимо противодействовать, в первую очередь, через привлечение студентов к участию в реальных исследованиях и разработках. Препятствует этому весьма низкое и нерегулярное бюджетное финансирование НИОКР, которое является основным для подавляющего числа организаций.

Программа «УМНИК», построенная и проводимая Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Фонд содействия, www.fasie.ru) с 2007 года, снимает до некоторой степени это препятствие, предоставляя для проведения молодежных научно-технических проектов индивидуальные гранты в размере до 500 тысяч рублей на два года. Условия предоставления гранта — «Существенная новизна разработки и среднесрочная перспектива коммерциализации результатов».

С 2009 года отбор победителей конкурса проходит в два этапа: первый этап — отбор номинантов на научно-технических конференциях, и второй этап — отбор победителей на Экспертном совете города — аккредитованном Фондом содействия финальном мероприятии. Экспертный совет формируется из представителей программных и организационных комитетов конференций, ведущих ученых города и представителей инновационных компаний, активно работающих с молодежью. Сегодня Экспертный совет насчитывает более 50 экспертов по всем поддерживаемым Фондом содействия научным направлениям, что позволяет наиболее объективно проводить отбор проектов-победителей. На заседаниях Экспертного совета, проходящих в течение 4 дней два раза в год (в мае и декабре), рассматривается до 200 проектов, сгруппированных по тематике, и отбирается до 100 победителей конкурса. Заседания Экспертного совета организуются Фондом ТВН, на них всегда присутствует представитель Фонда содействия, курирующий регион.

Таким образом, только на проведение молодежных научно-технических проектов по программе «УМНИК» в Санкт-Петербург ежегодно привлекается из средств Фонда содействия 40 млн рублей.

Программа действует уже четыре года, она развивается, в нее вовлекаются новые участники. Однако по сравнению с потенциалом города их число весьма мало.

Механизм организации конкурса отработывался на базе конференций Политехнического и Электротехнического университетов и Физико-технического института.

Далее по мере распространения информации число организаций-участников росло, тем не менее, на сегодня лишь в 10 университетах и 3 научных институтах города проводится (в том числе проводился хотя бы 1 раз) отбор номинантов конкурса. Вместе с тем в Петербурге насчитывается 47 государственных вузов. По крайней мере, в 28 из них ведется обучение естественным наукам, но только 5 университетов действительно активно участвуют в программе. Заметно, что если в числе первых победителей конкурса были в основном представители технических университетов, то сегодня бо-

лее активны медицинские вузы и институты — с 2010 года к программе подключились Медицинский университет им. И.П. Павлова, ФЦСКИЭ им. В. А. Алмазова, Медицинская академия постдипломного образования, НИИ онкологии им. Н. Н. Петрова.

Участие организаций в программе «УМНИК» определяется двумя факторами. Первый фактор — качество научно-исследовательской работы и работы с молодежью в организации. Второй фактор — наличие активной персоны, которая понимает важность поддержки молодежи, видит возможности и ресурсы, заложенные в программе, и готова внести свой личный вклад в её реализацию. Какой из этих двух факторов важнее — трудно сказать. Оба необходимы. И, безусловно, молодежь и единственная специализированная программа, которая её поддерживает, заслуживают более внимательного отношения к себе со стороны власти и научной общественности города. Какая это должна быть поддержка — предмет дискуссии и оценок возможностей.

Фонд ТВН (www.fondtvn.spb.ru) сопровождает ежегодно 140 проектов (первого и второго года), организует обучение руководителей проектов победителей (Умников), готовит специализированные тренинги, привлекает квалифицированных лекторов, в том числе из числа экспертов. Так, лекции по Седьмой рамочной программе читает действующий эксперт 7РП, сотрудник ФЦСКИЭ им. В.А. Алмазова, подготовлена 4-часовая видеолекция по финансовым вопросам, соответствующая среднему уровню знаний и потребностям Умников, лекции по интеллектуальной собственности (ИС) читает начальник отдела Патентного бюро, в недавнем прошлом сам Умник, выпускник Радиофизического факультета СПбГУ, к. ф.-м. н. Кроме того, регулярно проводятся индивидуальные консультации и тренинги для Умников.

Малая на сегодняшний день длительность программы не позволяет проследить во времени судьбу проектов и их исполнителей, тем не менее, первые данные позволяют сделать предварительные выводы.

Касательно планов Умников по развитию проекта, более половины респондентов подтверждают намерение коммерциализировать разработку. Треть респондентов планирует использовать для этой цели ресурсы программы Фонда содействия «СТАРТ», 26% респондентов предпочитают внедрять результаты на уже существующем предприятии, несколько рассчитывают на получение поддержки инновационного центра «Сколково», а в одном проекте рассматривается вариант продажи лицензии. Около половины респондентов планируют продолжение НИОКР при поддержке университета/института (38%), с привлечением грантовой поддержки (56%) или средств инвестора (6%). Лишь 3% респондентов не планируют продолжение проекта.

Планы Умников следует рассматривать как весьма реалистичные — возможность их осуществления подтверждается оценками результатов проектов. Успешность продаж при этом — вопрос, который всегда остается открытым.

МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР В МЮНСТЕРЕ: САМАЯ СОВРЕМЕННАЯ ЦЕНТРАЛИЗОВАННАЯ ЛАБОРАТОРИЯ



Часть сотрудников главной лаборатории МЦ в Мюнстере (слева направо): Маргарет Кемпер, медико-технический ассистент лаборатории, д-р Бернхард Шлютер, заведующий централизованной лабораторией, Гюнтер Вольперс, медицинский техник, Анна-Мария Гиатра, медико-технический ассистент, Клаус Бринк, медицинский техник, и д-р Манфред Фобкер, руководитель отдела клинической химии

В медицинском центре в Мюнстере завершилась крупнейшая за последнее десятилетие реорганизация централизованной лаборатории: улучшена рентабельность, расширен спектр предоставляемых услуг, оптимизированы исследовательские методики.

Медицинский центр в Мюнстере (МЦМ) предоставляет пациентам широкий спектр медицинских услуг. Клиника рассчитана на 1300 койко-мест. 7200 сотрудников центра ежегодно оказывают медицинскую помощь 43 000 стационарных и 200 000 амбулаторных пациентов. В 2002 году лаборатория прошла аккредитацию в DACH (Немецком органе по аккредитации в области химии) и в соответствии с DIN EN ISO 15189 и стала централизованной лабораторией МЦМ. Ежегодно предоставляется 3,3 млн лабораторных услуг для клиник и поликлиник МЦМ, больниц и частных врачебных практик как на региональном, так и на надрегиональном уровне. Прейскурант медицинских услуг включает 300 млн позиций.

Спектр предлагаемых анализов охватывает все направления лабораторной медицины, включая клиническую химию, гематологию и проточную цитофлюорометрию, исследование гемостаза, эндокринологию, иммунохимию и диагностику аутоиммунных заболеваний, лекарственный мониторинг и токсикологию, специальные анализы и молекулярную диагностику. Кроме того, в центральной лаборатории проводятся серологические и молекулярные исследования по диагно-

стике гепатита, ВИЧ и ЦМВ. Клиника оснащена системой централизованного управления данными по каждому пациенту на месте, а также передвижной педиатрической лабораторией для экстренных ситуаций в детском отделении реанимации и отделении для недоношенных детей. Помимо оказания непосредственно услуг медицинской помощи, Центр также выполняет функцию НИИ и предлагает услуги в области молекулярной диагностики.

К примеру, ежегодно проводится 130 000 секвенирований: лабораторный ПЦР-конвейер в режиме реального времени с системой автоматического забора образца и блоком Gen-chip расширяет возможности лаборатории и лучше всего подходит для комплексных исследований.

Центр лабораторной медицины состоит из трех секторов: с 2007 года централизованной лабораторией (оказание услуг медицинской помощи) руководит д-р мед. наук Бернхард Шлютер, исследовательский центр (аналитика и исследования) возглавляет проф., д-р мед. наук Джерци-Рох Нофер, а сектором обучения заведует д-р мед. наук Михаэль Эррен (обучение студентов по специальности медицина/стоматология). Кроме этих трех специалистов по лабораторной

медицине, в команду также входят три врача узкой специализации и группа лаборантов из 45 человек (руководитель группы Сибилле Шмитц).

Центр ориентирован на предоставление высококачественных медицинских услуг и удовлетворение любых нужд пациентов. При этом лабораторию выгодно отличает режим работы — круглосуточно 365 дней в году. Благодаря автоматизации рабочего процесса централизованная лаборатория может предложить гораздо более широкий спектр исследований в кратчайшие сроки: до 2 часов для рутинных исследований и менее часа для срочных проб.

Что касается электронной обработки данных, Центр лабораторной медицины круглосуточно поддерживается несколькими специалистами лаборатории по компьютерной обработке данных информационно-технологического центра МЦМ (лаборатория ИТЦ). Кроме того, собственная группа медицинских техников обеспечивает исправное функционирование всех аналитических систем. Таким образом, достигается максимальная отказоустойчивость всех аналитических систем лаборатории как со стороны компьютерной обработки данных, так и с сугубо технической стороны.

Главными направлениями работы Медицинского центра Мюнстера и медицинского факультета являются лечение воспалительных заболеваний, трансплантация органов, лечение заболеваний сердечно-сосудистой системы, нейрохирургия, пренатальная, перинатальная и репродуктивная медицина, а также лечение онкологических заболеваний.

Новая структура в 2007 году

До сентября 2007 года централизованная лаборатория была разделена на производственные секторы: лаборатория рутинных и срочных анализов, а также экстренных анализов хирургического отделения. Затем Институт клинической химии и лабораторной медицины был присоединен к Центру лабораторной медицины с вышеуказанной структурой. В середине 2008 года была внедрена новая лабораторная информационная система Opus::L, и аналитическая система обработки срочных образцов была интегрирована в лабораторию рутинных исследований. Позже была проведена поэтапная интеграция педиатрической лаборатории.

Осенью 2008 года стартовал общеевропейский тендер по автоматизации лаборатории. В начале 2009 года компания Сименс получила право на выполнение заказа. Среди причин переоборудования можно выделить следующие. Во-первых, в условиях конкуренции с другими лабораториями централизованная лаборатория МЦМ хотела увеличить свою производительность. Также была поставлена задача расширить спектр предоставляемых лабораторных услуг в соответствии с потребностями клиники. Кроме того, было необходимо сократить количество забираемых проб, уменьшив тем самым количество исследуемых пробирок.

Следующими этапами развития стали установка гематологической системы Systemx в 2009 году и начало совместной работы со специализированной онкогематологической лабораторией в области гематологии и гемостаза.



„Мы повысили рентабельность, расширив при этом спектр предлагаемых услуг и сократив сроки их предоставления».

Д-р Бернхард Шлютер, руководитель центральной лаборатории Медицинского центра в Мюнстере

Автоматизация рабочего процесса

Непосредственно после принятия решения начались фаза планирования и ввод в эксплуатацию системы автоматизации вплоть до установления штатного режима работы в сентябре 2009 года. Внедрение системы осуществлялось проектной группой при участии штатных специалистов (врача лаборатории / КС, лаборантов, специалистов по компьютерной обработке данных лаборатории, медицинских техников) и в тесном сотрудничестве с экспертами компании Сименс. Решающими факторами успешного внедрения системы автоматизации являлись активная работа и успешное сотрудничество всех участников. До начала и во время монтажных работ автоматизированной линии был сделан ремонт в помещениях и в целом улучшена ситуация с рабочими местами по таким пунктам как звукоизоляция, кондиционирование воздуха и освещение. В связи с размещением всех аналитических систем главной лаборатории в одном большом помещении удалось существенно оптимизировать перемещения лаборантов по лаборатории. В рамках проекта были также освобождены помещения для обустройства новых зон лаборатории (например, для масс-спектропии) или для отдыха сотрудников.

К единицам автоматизации относятся два анализатора ADVIA® 1800 для клинической химии, три иммунохимических анализатора ADVIA Centaur® XP, интегрированная система Dimension® RxL Max® для лекарственного мониторинга, один анализатор IMMULITE® 2500 и система управления образцами. Также были установлены анализаторы Dimension RxL Max и IMMULITE 2500 в качестве автономных и запасных систем.

Преаналитический этап все еще предполагает участие оператора в центрифугировании и распределении проб. Запланирован ввод упрощенной системы документации и установка центрифуги, интегрированной в систему автоматизации лаборатории. Два лаборанта поочередно управляют всей автоматизированной системой лаборатории посредством Centralink. Их поддерживают сотрудники, ответственные за систему.

Программное обеспечение для управления данными Centralink упрощает обработку дополнительных запросов, что при более строгом процессе установления показаний все чаще пользуется спросом. Улучшена процедура архивации проб. Рабочий процесс постоянно анализируется в сотрудничестве с экспертами компании Сименс в целях дальнейшего уменьшения времени обработки образца. Огромным пре-

имуществом системы автоматизации LabCell® является возможность подключения дополнительных систем с полным циклом обработки заказа в будущем, и, таким образом, можно будет настроить мощность автоматизированной линии в соответствии с растущими требованиями лаборатории или интегрировать новые технологические разработки в процесс автоматизации.

Приглашенные авторы

Д-р Бернхард Шлютер

Специалист по лабораторной медицине, руководитель центральной лаборатории МЦ Мюнстера, Альберт-Швайтцер-Штрассе, 33, 48129, Мюнстер

Д-р Патриция Микульчик

Руководитель отдела маркетинга и коммуникаций компании Сименс

ИНТЕРВЬЮ С СОТРУДНИКАМИ ЛАБОРАТОРИИ

После реструктуризации центральной лаборатории МЦМ и полугодовой работы в новом режиме была организована встреча с д-ром Бернхардом Шлютером, д-ром Манфредом Фобкером, руководителем отдела клинической химии, проф., д-ром Джерци-Рох Нофером, руководителем сектора исследований, и Анной-Марией Гиатра, представителем группы лаборантов. В ходе встречи обсуждались первые результаты работы.

Господин Шлютер, не могли бы Вы нам еще раз коротко рассказать, почему Вы в 2009 году выбрали компанию Siemens Healthcare Diagnostics?

Д-р Шлютер: Мы решили обновить оборудование централизованной лаборатории, чтобы повысить производительность и при этом снизить расходы. Решение в пользу Сименс мы приняли после определения и согласования критериев выбора компании-партнера. Решающими факторами стали рентабельность, опыт компании Сименс в области автоматизации рабочего процесса, опыт сотрудничества с компанией Сименс и предложение комплекса услуг от одного поставщика (широкий спектр параметров, сервис, автоматизированная обработка данных).

Какие положительные результаты принесла автоматизация лаборатории?

Д-р Шлютер: Мы смогли увеличить рентабельность Центра. Для обслуживания главной лаборатории нужно меньше сотрудников. А сотрудники были переведены в отдел специальной аналитики, благодаря чему мы смогли расширить спектр предлагаемых услуг. Спектр параметров был увеличен в соответствии с требованиями клиники, а новый режим работы позволяет повысить производительность лаборатории. Мы работаем круглосуточно, что позволяет анализировать до 2000 проб

«По некоторым параметрам, например, Lp(a) и тестостерон, мы можем отметить улучшение благодаря внедрению систем ADVIA»

Проф., д-р Джерци-Рох Нофер, руководитель исследования



«Важным гарантом успеха являлось то, что мы решились на изменения и активно претворяли их в жизнь»

Анна-Мария Гиатра, лаборантка и сотрудник основной группы





«Центральная лаборатория МЦМ является олицетворением новых тенденций в области медицины, что также приводит к благоприятному результату»

Д-р Бернхард Шлютер

ежедневно, а одна только система автоматизации позволяет обрабатывать до 400 проб в час. Ежегодно централизованная лаборатория проводит три миллиона анализов, из которых 80% приходится на клиническую химию и иммунохимию.

Благодаря снижению количества первичных пробирок мы экономим кровь пациентов. Этот положительный эффект мы хотим усилить, внедрив электронную систему учета поступления и отслеживания пробирок.

Централизованная лаборатория МЦМ представляет вместе с общей концепцией новые тенденции, что также благоприятно сказывается на репутации Центра.

Госпожа Гиатра, не могли бы Вы как представитель команды операторов выразить мнение, так сказать, рядовых сотрудников касательно нововведений? И какое было отношение к ним на момент реструктуризации?

Анна-Мария Гиатра: Сначала мы себе плохо представляли переход на новую систему. Но риск был оправдан. Конечно, мы столкнулись с трудностями, но сейчас они позади. Мы довольны результатом.

Д-р Шлютер: Госпожа Гиатра входила в ключевую группу, которая прекрасно справилась с первыми дежурствами: успех был во многом обеспечен работой великолепной команды лаборатории!

В дополнение к тому, что автоматизация такого масштаба была внедрена в существующую и функционирующую лабораторию, одновременно происходил процесс интеграции экспресс-лаборатории, включая педиатрические пробы со своими специальными требованиями, а также новые гематологические системы. Еще раз повторю, что мы не смогли бы достичь таких поразительных результатов без наших лаборантов.

Анна-Мария Гиатра: Важным гарантом успеха являлось то, что мы решились на эти изменения и активно претворяли их в жизнь. Мы очень гордимся тем, что многие процессы по оптимизации мы внедряли лично — это является хорошей мотивацией для дальнейшей работы! После того, как коллеги освоят обычные рабочие операции и смогут уверенно работать, мы перейдем к более существенным изменениям рабочего процесса.

Вы сказали, что согласились на переход на новую систему работы. Были ли у Вас когда-либо опасения касательно количества рабочих мест?

Д-р Шлютер: Ни один сотрудник не был сокращен в результате автоматизации лаборатории. Напротив, мы смогли разгрузить персонал и, таким образом, целенаправленно развивать спектр оказываемых услуг и расширить предложения по услугам.

Давайте перейдем к конкретным аспектам. В чем Вы видите положительные результаты внедрения отдельных модулей автоматизации лаборатории, господин Шлютер?

Д-р Шлютер: Большой плюс мы видим в возможности проследить за партиями реагента. Также мы отмечаем более простую обработку, улучшенную архивацию благодаря управлению пробамы через CentralLink. Работа с патологическими результатами исследований, которая была автоматизирована благодаря возможности проведения повторного тестирования без вмешательства оператора, позволяет нам осуществлять упрощенную поэтапную диагностику без утомительного поиска проб вручную. Управление качеством и документирование результатов соответствуют нашим требованиям.

Как отразилась автоматизация на рабочих процессах лаборатории?

Д-р Шлютер: Автоматизация позволяет получить гибкие решения благодаря аналитическим системам и интеграции преаналитических и постаналитических процессов. Таким образом, растет производительность без дополнительных затрат на увеличение штата сотрудников. Благоприятным фактором является также расширенный спектр исследований в соответствии с потребностями клиники. Благодаря имеющейся мощности можно проводить интегрированную обработку исследовательских проб и проб пациентов без ограничения медицинского обслуживания пациентов. Кроме того, мы можем проводить отдельную архивацию исследовательских проб через систему управления образцами для создания банка проб и для специальной аналитики.

Д-р Фобкер: Как уже сказал д-р Шлютер, благодаря автоматизации в основном секторе лаборатории появляется возможность развивать другие секторы, например, хроматографию, диагностику обмена веществ и аналитику микроэлементов. В МЦ Мюнстера существует большой спрос на поддержку исследовательских проектов, для которых должны быть созданы собственные дорогостоящие аналитические методы.

Господин Фобкер, какие следующие шаги намечены вместе с плановым внедрением центрифуги?

Д-р Фобкер: Мы планируем внедрить автоматизированную систему распределения проб, чтобы оптимизировать процесс оказания медицинских услуг пациентам и исследовательские процессы.

Следующим важным этапом, который мы планируем осуществить в сотрудничестве с компанией Сименс, будет шаг в сторону комплексного решения для автоматизированной обработки данных и возможность работать через платформу с унифицированными операционными системами — так сказать, от лабораторных решений до лабораторной информационной системы.

После того, как мы обсудили сектор медицинского обслуживания пациентов, остался еще один интересующий нас вопрос касательно исследований, которые Вы проводите в централизованной лаборатории. Господин Нофер, каким видом исследований Вы занимаетесь?

Проф. д-р Нофер: С одной стороны, мы предлагаем внутренний сервис: все клинические исследования в МЦМ, которые заказывают наши отделы, проходят через нас. С другой стороны, мы получаем также внешние заказы от ветеринаров, фармацевтов, сотрудников пищевой промышленности. Так, например, мы проводили исследование осадка щавелевой кислоты в моче после употребления различных сортов шпината, приготовленного различными методами.

Кроме того, как для внутренних, так и для внешних заказчиков исследуются параметры, которые нельзя найти в перечне обычных лабораторных исследований.

За последние два года мы провели в целом 150 различных исследований, от маленьких до больших групп пациентов.

Не могли бы Вы рассказать нам об одном из таких исследований?

Проф. д-р Нофер: Мы как раз завершили мультицентровое исследование по заказу Procardis-Consortium, которое длилось 2,5 года и в котором приняли участие 6000 человек. Результаты исследования были недавно опубликованы в NEJM. Предметом исследования был вопрос, могут ли разные генетические варианты Lp(a) влиять на риск возникновения коронарной болезни сердца. Мы начали исследования проб при помощи предыдущей аналитической системы и при переходе на аналитическую систему ADVIA отметили скачок качества измерения показателей.

После оценки клинической картины, сравнения значений с показаниями Вестерн-блоттинга и сравнения показателей с базовыми значениями мы определили, что значения, которые измерялись на новой системе, соответствовали фактическим.

Этот факт, а также небольшой промежуток времени — от двух до трех недель, — в течение которого мы могли выполнить исследования и предоставить результат заказчику благодаря высокоэффективным системам ADVIA, вызвали большой положительный резонанс не только у нас, но и у заказчиков в Англии, поскольку при получении заказа мы исходили из срока в 3 месяца.

Какие выводы были сделаны по данному исследованию?

Проф. д-р Нофер: Lp(a) является независимым фактором риска для коронарной болезни сердца. Кроме того, исследование показало дополнительные результаты относительно значения генетических детерминант концентрации Lp(a) и изоформ Lp(a) — от генотипа к фенотипу. Также после внедрения систем ADVIA мы можем отметить положительную динамику по другим исследуемым параметрам, например, тестостерону. Ложноположительные данные становились причиной дополнительного беспокойства пациентов и вели к дальнейшей диагностике, которой можно было бы избежать. Здесь мы также смогли скорректировать недостоверные результаты. Так как речь шла об онкологической проблеме, то такая корректировка важна как для врача, так и для пациента.

В заключение нашей беседы хотелось бы услышать напутствие от Вас, господин Шлютер.

Д-р Шлютер: Как было отмечено в начале разговора, главной целью перехода на новое оборудование является рентабельность, и поэтому мы хотели автоматизировать как можно больше процессов. Но спустя полгода работы мы уже разграничиваем процессы и смотрим, что действительно является целесообразным автоматизировать. Определенные исследования и нечасто запрашиваемые параметры мы продолжаем обрабатывать в ручном режиме: например, церулоплазмин на нефелометре производства, кстати, компании Сименс.

Мы благодарим Вас за такой не только содержательный, но и очень приятный разговор.

Дония Дронка, сектор маркетинга отделения клинической химии
ADVIA измерительные системы и методы

ПЕРСПЕКТИВЫ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОГО СОТРУДНИЧЕСТВА

ЗАО «Ламинарные системы» заключило соглашения о научно-техническом сотрудничестве с ведущими противочумными предприятиями России. В рамках соглашений этим предприятиям было предоставлено оборудование для испытаний и независимого тестирования — бокс микробиологической безопасности II класса БАП-01-«Ламинар-с»-1,2 нового поколения, отвечающий всем требованиям Российского стандарта ГОСТ Р ЕН 12469 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности».

Основная цель данного сотрудничества — проведение совместных исследований, направленных на обеспечение безопасности персонала при использовании боксов микробиологической безопасности; разработка рекомендаций, правил, приемов и методов безопасной работы; отработка методик проверки предоставленного на испытания оборудования.

По результатам испытаний и тестирований специалисты противочумных предприятий составят заключение с предложениями и замечаниями по усовершенствованию технологических возможностей оборудования.

Первым этапом и началом работы в этом направлении стали выездные презентации, рассказывающие о возможностях предприятия, о новых разработках, технических и эксплуатационных характеристиках производимой продукции, а также о применяемых на предприятии методиках тестирования боксов микробиологической безопасности.

Также специалисты ЗАО «Ламинарные системы» приняли участие в организации семинара сервисных инженеров по теме «Обслуживание, валидация и сертификация шкафов биологической безопасности» на базе Клинического учебно-демонстрационного центра по организации противотуберкулезного инфекционного контроля ЦНИИТ РАМН и ОПТД в городе Владимир.

Среди преподавателей курса были ведущие специалисты ЦЕНТРА ПО КОНТРОЛЮ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ПРОФИЛАКТИКЕ (США, CDC), ИНСТИТУТА ИГЛСОН (США), ЦЕНТРАЛЬНОГО НИИ туберкулеза (Москва), ОБЛАСТНОГО ПТД (Владимир), а также ЗАО «ЛАМИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ». Основными темами докладов и презентаций семинара стали вопросы биологической безопасности, классификация оборудования, методики проведения сертификационных испытаний, сравнение стандартов EN, NSF и ГОСТ.

Практическое обучение сервисных инженеров прошло с использованием бокса микробиологической безопасности II класса защиты производства ЗАО «Ламинарные системы». Американские специалисты продемонстрировали на нем методику визуализации воздушного потока (см. видео на www.lamsys.ru), а также методику обработки фильтров парами формальдегида. В свою очередь, представителем ЗАО «Ламинарные системы» была показана применяемая на предприятии методика сканирования открытой поверхности фильтра при проверке его целостности, а также способ замены HEPA фильтра.

Семинаристы на практике увидели, каким образом могут проверяться:

- скорость воздушного потока (воздухозабор и нисходящий поток);
- целостность фильтров (аэрозольный тест PAO);

- уровень освещенности / шума / вибрации;
- герметичность корпуса.

По результатам проведенных испытаний американские специалисты дали высокую оценку новому боксу производства ЗАО «Ламинарные системы», отметив его соответствие мировым стандартам и ряд конструктивных преимуществ.

Обучающие семинары на базе владимирского Клинического учебно-демонстрационного центра по организации противотуберкулезного инфекционного контроля ЦНИИТ РАМН и ОПТД проходят на регулярной основе. Учитывая важность и актуальность тематики, специалисты ЗАО «Ламинарные системы» планируют принимать участие в организации большинства проводимых семинаров, оказывая посильную помощь в методическом и техническом их обеспечении.

Предприятие также приглашает к сотрудничеству заинтересованные научно-исследовательские институты, предприятия Роспотребнадзора, клинико-диагностические лаборатории и т. п. с тем, чтобы общими усилиями совершенствовать методическую и нормативную базы в области производства, эксплуатации и тестирования специализированного лабораторного оборудования.



Бокс микробиологической безопасности производства ЗАО «Ламинарные системы» на тестовых испытаниях в учебном классе областного ПТД, г. Владимир