



№1 (45) февраль 2013

КЛИНИКО - ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНСИЛИУМ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Главный редактор:

Эмануэль В. А., д. м. н., проф.

Заместители главного редактора:

Зыбина Н. Н., д. б. н., проф.

Сухоруков В. С., д. м. н., проф.

Директор редакции:

Чередниченко Д. В., к. м. н.

Зав. редакцией:

Эмануэль Ю. В., к. м. н.

Редактор перевода:

Филиппова Н. А., к. м. н.

Ответственный секретарь:

Калимулина О. П.

Адрес редакции:

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

Телефон редакции:

(812) 233 97 26

Эл. почта:

ejvcons@mail.ru

Журнал зарегистрирован

в 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»

Решением Методического Совета

СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова

от 04.10.2010 журнал является

учебно-методическим пособием

для всех кафедр университета

при реализации циклов повышения

квалификации на ФПО.

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 № 284



Редколлегия



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

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Антонова И.Н.,
д. м. н., профессор,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Кишкун А.А.,
д. м. н., профессор, Заслуженный врач РФ,
Российская ассоциация медицинской лабораторной
диагностики, Москва |
| Афанасьев Б.В.,
д. м. н., профессор,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова | Ларионова В.И.,
д. м. н., профессор, в. н. с. ФГБУ «НИДОИ
им. Г.И. Турнера» Минздравсоцразвития России |
| Вавилова Т.В.,
д. м. н., СЗГМУ им. И. И. Мечникова, СПб | Лиознов Д.А.,
д. м. н., 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 |
| Карпищенко А.И.,
д. м. н., профессор, СПб ГУЗ МИАЦ | Эмануэль В.Л.,
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.,
академик РАМН, д. м. н., профессор, 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, ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН
(Санкт-Петербург) | Соколовский Е.В.,
д. м. н., профессор,
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова |
| Дубина М.В.,
член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор,
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.,
академик РАМН, д. м. н., профессор, з. д. н. РФ,
СЗГМУ имени И. И. Мечникова (Санкт-Петербург) | Шляхто Е.В.,
академик РАМН, д. м. н., профессор, 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 | |

Содержание

ПОЗДРАВЛЕНИЕ	1
РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ, РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ	2
<i>Т. И. Долгих</i>	
СОВРЕМЕННАЯ ПРЕАНАЛИТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ, МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ: РЕАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РОССИЙСКОЙ МЕДИЦИНЫ	4
<i>А. Б. Чухловин, А. А. Богатилов, А. С. Кузьмичев</i>	
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ТЕЧЕНИЯ И ИСХОДА РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	7
<i>М. И. Зарайский, Е. Е. Зуева, А. Б. Чухловин, Д. В. Чередниченко, Е. Б. Морозова, О. В. Галкина, А. С. Бельтюкова, М. В. Горчакова, И. Ю. Сабурова, А. В. Артемьева, К. Ю. Слободнюк, Е. Б. Русанова, М. В. Иванченко, М. Е. Борискова, У. В. Фарафонова, М. А. Быков, Д. Ю. Семенов</i>	
ОНКОПАСПОРТ-СКРИНИНГ — СИСТЕМА СТАНДАРТИЗИРОВАННОЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ГЕНОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГРУПП НАСЕЛЕНИЯ С ПОВЫШЕННЫМ РИСКОМ РАЗВИТИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	13
<i>И. Э. Ушал, И. И. Шантырь, М. В. Яковлева</i>	
ИНФОРМАТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЭЛЕМЕНТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ В ДИАГНОСТИКЕ ОСТЕОПЕНИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ЛИКВИДАТОРОВ ПОСЛЕДСТВИЙ АВАРИИ НА ЧАЭС	19
<i>М. В. Иванченко, Е. Е. Зуева</i>	
ПЕРВИЧНЫЙ ИММУНОДЕФИЦИТ У ВЗРОСЛЫХ. КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ	23
<i>Т. Г. Скороходова, С. В. Матушкина, Д. А. Грищенко</i>	
СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ	33
<i>Ю. В. Эмануэль, А. Л. Хотин</i>	
РЕАЛИЗАЦИЯ ТРЕБОВАНИЙ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА В ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ: ИЗМЕРЕНИЕ ПРОДУКЦИИ И ПРОЦЕССОВ, АНАЛИЗ И УЛУЧШЕНИЕ	37
<i>М. К. Бехтерева</i>	
СИНДРОМ КАВАСАКИ В ПРАКТИКЕ ПЕДИАТРА И ИНФЕКЦИОНИСТА	44
ВЛИЯНИЕ НОВЫХ АНТИКОАГУЛЯНТОВ НА РЕЗУЛЬТАТЫ КОАГУЛОГРАММЫ	50

СОВРЕМЕННАЯ ПРЕАНАЛИТИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ, МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ: РЕАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РОССИЙСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Т. И. ДОЛГИХ

Омская государственная медицинская академия, г. Омск

Резюме. В статье рассмотрена проблематика проведения таких исследований, как иммунологические, молекулярно-биологические и молекулярно-генетические в условиях стандартизации клинико-диагностических лабораторий, а также возможность повышения качества лабораторных анализов.

Ключевые слова: преаналитический этап, стандартизация, венепункция, венозная кровь, молекулярно-генетические исследования, молекулярно-биологические исследования, иммунология, вирусные заболевания, вакуумные системы забора крови.

MODERN PREANALYTICS IN IMMUNOLOGICAL, MOLECULAR BIOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC INVESTIGATIONS: REAL POSSIBILITIES OF RUSSIAN MEDICINE

T. I. DOLGIKH

State budget educational institution of higher professional education "Omsk State Medical Academy" Ministry of Health Care of Russian Federation, Omsk

Summary. The article considers the problems of clinical tests in standardization of laboratory as immunology, molecular biology and molecular genetic and the ability of improvement of quality of these clinical tests.

Key words: preanalytical phase, standardization, venipuncture, venous blood, molecular genetics, molecular biology, immunology, viral diseases, evacuated tube systems.

Данные для корреспонденции:

Долгих Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, профессор кафедры эпидемиологии, заведующая Центральной научно-исследовательской лабораторией, руководитель Академического центра лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии
e-mail: prof_dolgih@mail.ru

В настоящее время в условиях модернизации здравоохранения России важное значение придается стандартизации лабораторных исследований, направленных на повышение качества и эффективности работы [1, 2]. Значительному улучшению качества рутинных гематологических, биохимических и серологических исследований способствовало внедрение в медицинскую практику требований национального стандарта (ГОСТ Р 53079.4-2008) [3] в части ведения преаналитического этапа в соответствии с рекомендациями ВОЗ [4]. Эти документы регламентируют проводить сбор образцов венозной крови в одноразовые контейнеры «при наличии строго определенных добавок» в зависимости от назначенного вида исследования (ИСО 6710:1995) [5].

Вместе с тем, как показывает мировая практика, современная преаналитика имеет достаточно мощный потенциал для улучшения качества «проблемных» ключевых исследований, который в России реализуется далеко не в полную меру. К ним следует отнести: иммунологические и молекулярно-биологические методы

(работа с культурой клеток, определение уровня внутриклеточных цитокинов, фенотипа лимфоцитов с использованием проточной цитофлюориметрии), а также широко используемые молекулярно-генетические исследования, прежде всего ПЦР-анализ. Результативность работы лаборатории и эффективность этих методов (порой — высокотехнологичных, уникальных и финансово-затратных, требующих длительной подготовки специалистов) нередко снижается, если не учитывается влияние внешних долабораторных факторов, к которым относится и преаналитика [6]. С проблемой качества преаналитической фазы напрямую связаны все иммунологические и ПЦР-лаборатории, в том числе лаборатории специализированных учреждений, инфекционных больниц и центров по профилактике и борьбе со СПИД, а также научные центры, занимающиеся молекулярной диагностикой.

Наряду с этим, рост частоты инфицирования популяции вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирусом гепатита С, развитие молекулярной медицины

и связанные с ней новые возможности диагностики, мониторинга, лечения и прогнозирования ставят новые задачи перед нами как в формате качества, так и в плане обеспечения безопасности пациента и медицинского персонала, что достигается использованием закрытых систем забора крови и пробирок однократного применения.

Надо признать, что во многих лабораториях, особенно в условиях централизации исследований и аутсорсинга (нередко с транспортировкой биоматериала в другие города), преаналитика остается «слабым звеном». Это снижает эффективность работы, поскольку приводит:

- к недостоверным данным (высокая погрешность и низкая воспроизводимость анализа, например, при определении вирусемии и «вирусной нагрузки»);
- к увеличению частоты ложно-положительных и ложно-отрицательных результатов, требующих дополнительных исследований и, соответственно, финансовых затрат и увеличения нагрузки на персонал;
- к моральным издержкам и конфликтам из-за ошибки в постановке диагноза, особенно базирующегося на результате лабораторного исследования (например, при вирусных гепатитах В и С, ВИЧ-инфекции);
- к неправильной тактике ведения пациента и существенным затратам при назначении необоснованной терапии (например, при остаточной микробной болезни или инфекциях);
- к некорректной оценке риска развития определенных заболеваний из-за генетической предрасположенности (например, рак молочной железы) или влияния генетических факторов на патогенез заболевания (например, при оценке состояния системы гемостаза у пациентов с сердечно-сосудистой патологией или тромбофилиями).

В настоящее время следует провести корректирующие мероприятия по стандартизации долабораторной преаналитики в следующих направлениях медицины:

- скрининг, арбитраж, мониторинг на ВИЧ-инфекцию и вирусные гепатиты (детекция ДНК или РНК, определение вирусемии, вирусной нагрузки, оценка эффективности противовирусной терапии);
- диагностика оппортунистических, в том числе СПИД-индикаторных инфекций (туберкулез, цитомегаловирусная инфекция, герпетическая инфекция, токсоплазмоз и др.);
- диагностика перинатальной патологии (в том числе перинатальных инфекций);
- состояние и функциональная оценка иммунного статуса;
- выявление опухолевых клеток и их типирование;

- определение чувствительности к лекарственным препаратам;
- определение генов-маркеров наследственных заболеваний;
- оценка риска развития заболеваний при наличии генетической предрасположенности (например, рак молочной железы, колоректальный рак);
- фармакогенетика и фармакогеномика.

Во всех случаях в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 15189-2009 и ГОСТ Р 53079.4-2008 [1, 3] специалисты лаборатории должны дать (с учетом специфики учреждения) четкие указания (в письменном виде) медицинским (научным) работникам, формирующим заказ и осуществляющим флеботомию, в какие пробирки следует осуществлять забор крови для планируемых исследований с целью получения сыворотки, плазмы или лимфоцитарно-моноцитарной взвеси (указать цвет крышки в соответствии с международным кодификатором, наполнитель, необходимый объем, количество перемешиваний, условия хранения и доставки).

Система эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией предъявляет жесткие требования к качеству исследований как в референс-лабораториях, так и в скрининговых лабораториях. Однако это невозможно обеспечить без должного уровня преаналитики в учреждениях первичного звена (взятие крови закрытыми системами в пробирки с соответствующими наполнителями). Практически во всех городах России идет перемещение большого количества пробирок с образцами крови в централизованные лаборатории, в том числе для скрининга на ВИЧ-инфекцию, основанного в соответствии с СП 3.1.5.2826-10 [7] на выявлении антител к ВИЧ и вирусных антигенов, а в особых случаях — на выявлении провирусной ДНК ВИЧ и вирусной РНК ВИЧ (у детей первого года жизни).

Высокие требования предъявляются и к донорству (тестирование донорской крови на наличие антигена/антител и генетического материала ВИЧ; необходимость длительного хранения образца крови (архивирование биоматериала)). Более того, увеличивается количество ВИЧ-инфицированных лиц и пациентов с хроническими вирусными гепатитами В и С, требующих систематического (длительного) мониторинга состояния иммунной системы и оценки эффективности противовирусной терапии.

Все шире проводится обследование на ВИЧ-инфекцию в различных медицинских учреждениях с использованием быстрых тестов. В соответствии с СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции» (п. 4.8.2) [7] каждое исследование на ВИЧ с применением простых/быстрых тестов (область их применения изложена в п. 4.8.1) должно сопровождаться параллельным тестированием той же порции крови классическими методами ИФА и ИБ. Поскольку на ранних стадиях ВИЧ-инфекции выявление антигена ВИЧ p24 имеет важное значение, особенно на фоне отсутствия или ограниченного

синтеза антител, то предпочтителен выбор пробирки с высокой возможностью сохранения антигена/антител и длительного хранения образца в первичной пробирке (для исключения ошибки при аликвотировании). Наилучшим вариантом для обеспечения качества пробы с исключением (снижением риска) гемолиза [8] и, главное, с сохранением не только уровня антител, но и уровня антигенов ВИЧ (p24), вирусов гепатита В и С, является взятие крови в вакутейнеры со скошенным гелем — BD Vacutainer® SST II Advance [9]. Такая же проблема стоит и в донорстве.

Какие же пробирки необходимо использовать в конкретных случаях?

1. В тех случаях, когда исследованию будет подвергнута плазма, для ее получения, особенно в случае транспортировки биоматериала, целесообразно проводить забор крови в вакутейнеры с гепарином лития и разделительным гелем (светло-зеленая крышка) — BD Vacutainer® PST™ II.

2. В тех случаях, когда необходимо выделить мононуклеары, вполне обосновано использование вакутейнеров BD Vacutainer® CPT™, которые были нами отобраны в поиске решения проблемы стандартизации преаналитического и аналитического этапов с приоритетом безопасности. В отличие от традиционного способа выделения мононуклеаров, отличающегося трудоемкостью, отсутствием стандартизации и возможностью контакта сотрудника с кровью, BD Vacutainer® CPT™ представляет собой закрытую одноэтапную систему для сбора, выделения мононуклеарных клеток, транспортировки с возможностью длительного хранения. Это стеклянные пробирки с сине-черной пробкой (наполнитель — цитрат натрия/фиколл/гель) или с красно-зеленой пробкой (наполнитель — гепарин натрия/фиколл/гель). Разделение клеток в градиенте плотности фикола при центрифугировании в таких пробирках с гелевым барьером значительно ускоряет исследование: прямое выделение мононуклеарных клеток из крови происходит за 20 минут с гарантией высокого выхода лимфоцитов и моноцитов (независимо от уровня подготовки специалиста лаборатории). Преимуществом использования вакутейнеров BD Vacutainer® CPT™ является не только увеличение количества анализируемых проб, но и их уникальность в части сохранности мононуклеарных клеток после хранения при низких температурах (не менее 90% при температуре до -80°) [10].

3. Для молекулярно-генетических методов (в том числе для ПЦР диагностики) целесообразно забирать кровь в вакутейнеры BD Vacutainer® PPT™, в производстве которых для стандартизации используется сухой распыленный К2ЭДТА. Наличие гелевого барьера устраняет необходимость использования вторичных пробирок, что менее трудоемко в работе, позволяет увеличить производительность труда и стабилизацию образцов при транспортировке и хранении. Образцы, собранные в пробирки BD Vacutainer® PPT™, могут хра-

ниться в течение 6 часов при комнатной температуре, а также в замороженном виде без влияния на результаты анализов на ВИЧ [11].

Они предназначены для молекулярной диагностики ВИЧ-инфекции и вирусных гепатитов В и С, в том числе для выявления генетического материала вирусов и генотипирования (в качественном варианте ПЦР), а также для определения вирусной нагрузки и выявления резистентности к лекарственным препаратам (в количественном варианте — формат «реального времени»). Эти пробирки также нашли свое применение при создании банка крови (возможность анализа и длительного хранения пробы крови в архиве в первичной пробирке, что исключает ошибку при идентификации проб).

Таким образом, мировой опыт обеспечения стандартизации преаналитического этапа иммунологических и молекулярно-генетических исследований может успешно применяться в медицинской практике России, что способствует повышению качества работы, достоверности анализа и обеспечивает безопасность медицинских работников и научных сотрудников.

Литература

1. ГОСТ Р ИСО 15189-2009 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
2. Меньшиков В. В. Зачем клинической лаборатории нужна стандартизация? // Учебно-методическое пособие. М.: Лаборатория, 2012: 71.
3. ГОСТ Р 53079.4-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.
4. ВОЗ. Применение антикоагулянтов и стабильность проб крови, сыворотки, плазмы. Женева, 2002.
5. ИСО 6710:1995 Контейнеры одноразовые для сбора образцов венозной крови.
6. Долгих Т. И. Снижение профессиональной заболеваемости и обеспечение безопасности труда медицинских работников // Справочник заведующего КДЛ. 2011; 8: 11–15.
7. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.5.2826-10 Профилактика ВИЧ-инфекции.
8. Mensel B., Wenzel U., Roser M., Lüdemann J., Nauck M. Considerably Reduced Centrifugation Time without Increased Hemolysis: Evaluation of the New BD Vacutainer®SST™II Advance // Clinical Chemistry. 2007; 53 (4).
9. Gobin E., Desruelle J. M., Vigier J. P. Evaluation of the analytic performance of blood collection tubes (BD Vacutainer SST) for the screening of anti-HIV, anti-HTLV, anti-HCV, anti-HBc, anti-CMV antibodies, and of HBs, P24 HIV antigens, and of alanine aminotransferase // Transfus Clin Biol. 2001 Feb; 8 (1): 44–50.
10. Ruitenbergh J. J., Mulder C. B., Maino V. C., Landay A. L., Ghanekar S. A. VACUTAINER® CPT™ and Ficoll density gradient separation perform equivalently in maintaining the quality and function of PBMC from HIV seropositive blood samples // BMC Immunology. 2006; 7: 11.
11. Fernandes H., Morosyuk S., Abravaya K., Ramanathan M., Rainen L. Parameters for Plasma Preparation Tubes on Viral Load Measurements Obtained by Using the Abbott RealTime HIV-1 Load Assay // Journal of Clinical Microbiology. July 2010; 48 (7): 2464–2468.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ТЕЧЕНИЯ И ИСХОДА РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А. Б. ЧУХЛОВИН¹, А. А. БОГАТИКОВ², А. С. КУЗЬМИЧЕВ²

¹ ГБОУ ВПО СПбГМУ имени акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ
Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

Резюме. В обзорной статье рассматриваются вопросы практического применения молекулярно-генетических маркеров для диагностики рака щитовидной железы (РЩЖ) и мониторинга его лечения. Особое внимание уделяется специфическим соматическим онкогенным мутациям, прежде всего — генов BRAF и RET, а также клиническим данным об их использовании для выявления раковых клеток в тонкоигольных биоптатах. Обсуждается ряд проблем, связанных с анализом генной экспрессии в тканях щитовидной железы, особенно в случаях множественной эндокринной неоплазии (МЭН2). Подчеркивается необходимость разработки новых генных маркеров, пригодных для диагностики фолликулярного и анапластических форм РЩЖ.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, генные маркеры, соматические мутации, клинические тесты.

MOLECULAR GENETICS APPROACHES TO PREDICTION OF CLINICAL COURSE AND OUTCOMES OF THYROID CANCER

A. B. CHUKHLOVIN¹, A. A. BOGATIKOV², A. S. KUZMICHEV²

¹ State budget educational institution of higher professional education “Saint-Petersburg State Pavlov Medical University” Ministry of Health Care of Russian Federation

Clinical laboratory diagnosis department with a course of molecular medicine

² Petersburg State Pediatric Medical University

Summary. The review article deals with practical applications of nucleic acid markers for diagnostics of thyroid cancer and monitoring its treatment. Highlighted are specific somatic oncogene mutations (RET, BRAF etc.), as well as clinical data on their utility when detecting cancer cells in fine-needle biopsies. Some problems of gene expression studies in this field are discussed, especially in cases of multiple endocrine neoplasia (MEN2). A need is stressed for novel genetic markers suitable for diagnostics of follicular and anaplastic thyroid neoplasia.

Keywords: thyroid cancer, gene markers, somatic mutations, clinical tests.

Данные для корреспонденции:

Чухловин Алексей Борисович, д. м. н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ГБОУ ВПО СПбГМУ имени акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, e-mail: alexei.chukh@mail.ru

Актуальность проблемы

Эпидемиологические исследования последних десятилетий свидетельствуют о росте заболеваемости раком щитовидной железы (РЩЖ) во многих регионах мира в 1,3–2 раза. В различных странах показатели заболеваемости раком ЩЖ составляют 0,6–5,0 на 100 000 населения у мужчин и 1,2–16 — у женщин. Рак ЩЖ наблюдается у женщин приблизительно в 3 раза чаще, чем у мужчин. По темпам прироста этого заболевания (9,2% в год) следует признать его одной из ведущих форм среди злокачественных новообразований.

Основными факторами, повышающими риск развития РЩЖ, являются: наличие в анамнезе облучения

головы и шеи, семейный анамнез РЩЖ, возраст, пол, наличие заболеваний, встречающихся в рамках множественных эндокринных неоплазий. Также, по мнению некоторых авторов, содержание йода и других микроэлементов в окружающей среде может влиять на развитие и течение рака ЩЖ. Высказано предположение, что в не эндемичных по зобу областях развитию рака ЩЖ способствуют другие факторы, такие как радиационный фон, загрязненность среды тяжелыми металлами [1].

При всей сложности процессов канцерогенеза и прогрессии злокачественных новообразований, несомненна роль генетических мутаций, в частности — в семейных случаях раковых заболеваний. В последние годы становится очевидной ключевая роль соматических мутаций,

представляющих собой стойкие изменения генома, возникающие на протяжении жизни индивида и выявляемые в различных опухолевых тканях.

Сочетание рака ЩЖ с опухолями репродуктивной системы

Явление первичной множественности опухолей, особенно сочетание рака ЩЖ с опухолями репродуктивной системы у женщин — актуальная проблема онкологии. При этом исследований, посвященных эндокринной полинеоплазии, особенно течению и прогнозу, в литературе немного, хотя эти синдромы известны уже десятки лет [2, 3].

Существенной особенностью здесь является синхронное возникновение рака ЩЖ и опухолей репродуктивной системы, которое имеет место у 39% больных [3].

По литературным данным, поражение регионарных лимфатических узлов метастазами при РЩЖ на фоне эндокринной полинеоплазии встречается чаще — от 29 до 65,9% случаев, однако частота встречаемости отдаленных метастазов рака ЩЖ не отличается от группы больных без полинеоплазии [1, 4].

В целом, вопросы ассоциации новообразований различной локализации у одних и тех же больных и патогенез семейных форм рака в последние годы начали успешно изучаться с применением методов молекулярной генетики. Этой проблеме посвящен целый ряд обзоров, например [5]. Авторы рассматривают концепцию множественной эндокринной неоплазии (МЭН) типа 2, известной с 60-х гг. XX века, представляющей собой сочетание медуллярного РЩЖ, феохромоцитомы и первичного гиперпаратиреозидизма

Помимо обширных клинических исследований, в настоящее время широко применяются методы ДНК-скрининга — риска генов повышенного риска МЭН2. Выявлены большие проблемы при оценке результатов генеалогических и молекулярно-генетических данных в различных популяциях и семьях с этой патологией, что показано при анализе спектра мутаций гена RET и их передачи в поколениях. Таким образом, гетерогенность известных мутаций при множественной эндокринной неоплазии не позволяет пока разработать стандартные методы диагностики в этих ситуациях.

Соматические мутации в диагностике рака щитовидной железы

Одним из практических результатов прогресса, достигнутого в последние годы в исследовании рака, является идентификация нового класса опухолевых маркеров, а именно генетических признаков, определение которых во многом основано на выявлении аномальных последовательностей ДНК, а также экспрессии протоонкогенов, генов-супрессоров опухолей, генов клеточных рецепторов, полиморфных генных вариантов и других функционально значимых сегментов генома, специфические повреждения которых являются причи-

ной или модифицирующим фактором канцерогенеза [6, 7].

На протяжении многих лет исследуются возможности прогнозирования течения и исхода РЩЖ на основании изучения ploидности клеток и содержания ДНК. Анеуплоидия, которая чаще наблюдается у пожилых больных, рассматривается как неблагоприятный фактор при хирургическом лечении [8]. Ухудшение прогноза в случае анеуплоидных опухолей отмечено рядом исследователей при папиллярном раке [9], фолликулярном раке [10].

Общим для формирования опухолей любого органа является нарушение механизмов нормальной клеточной пролиферации, что связано с изменениями в регуляторных процессах обычного клеточного цикла. Так, для любой опухоли характерна повышенная экспрессия онкогенов семейства *ras*, извращение обычной супрессорной функции генов-супрессоров роста опухоли [11]. Однако, несмотря на то, что данные изменения в целом являются аналогичными для любой опухоли, существуют некоторые характерные особенности, связанные с морфологическим типом опухоли, степенью ее дифференцировки, а также со средовыми условиями. В генезе тиреоидных неоплазий описано несколько мутаций, хотя ни одна из них по отдельности не способна вызывать злокачественное перерождение без сопутствующих совместно действующих мутаций [12]. Наличие таких особенностей делает проведение исследований молекулярных механизмов тиреоидного канцерогенеза весьма перспективным и представляет значительный интерес.

Исследования последних лет позволили идентифицировать сигнальные пути, контролируемые большинством этих генов. Выяснилось, что многие из них регулируют активность одних и тех же путей на разных этапах передачи внутриклеточных сигналов. Оказалось также, что некоторые из таких сигнальных путей одновременно вовлечены в регуляцию нескольких важнейших физиологических процессов [12, 13, 14].

Роль соматических мутаций при спорадическом раке ЩЖ в настоящее время изучена недостаточно. Вероятно, они не являются этиологическими факторами канцерогенеза, но, по данным многих исследователей, могут участвовать в патогенезе РЩЖ, определяя его клиническое течение и прогноз [6]. Папиллярный рак ЩЖ с позиции молекулярной биологии представляет собой наиболее полно охарактеризованную неоплазию ЩЖ в отношении взаимосвязи эпидемиологических факторов риска (радиационно-индуцированный или спорадический папиллярный РЩЖ) с имеющимся на молекулярном уровне дефектом [15].

Одной из причин в развитии рака ЩЖ может являться мутация рецептора тиреотропного гормона. В течение последних нескольких лет мутации рецептора ТТГ активно изучались с целью выяснения причины приобретенных наследственных и врожденных заболеваний, а также рака щитовидной железы [16].

ТТГ модулирует действие митогенных факторов: усиливает действие ИРФ-1, повышает экспрессию на тиреоцитах рецепторов к эпидермальному фактору роста, сенсибилизируя клетки к воздействию этих факторов роста. Под воздействием ТТГ отмечается усиление транскрипции ряда онкогенов: быстрый кратковременный подъем транскрипции *c-myc*, повышение концентрации *m-RНК c-fos* [17].

При опухолях ЩЖ выявлена отрицательная корреляция степени дифференцировки опухоли и ее способности связывать ТТГ. С потерей дифференцировки опухоли снижается экспрессия не только рецептора ТТГ, но и тиреопероксидазы, а также транскрипция гена тиреоглобулина.

Данные о возможной роли различных онкогенов в развитии рака ЩЖ были ранее обобщены в обзорной работе [18]. В числе генов, мутации которых важны для развития РЩЖ, обычно указывают: онкоген *RET*, онкоген *ras*, ген *p53* (ген «клеточного суицида»), экспрессия которых изменена в опухолевой ткани. Эффекты этих нарушений, вероятно, различны для опухолей с разным уровнем дифференцировки. По данным, суммированным этими авторами, агрессивность и исходы течения ПРЩЖ могут определяться целым рядом генетических (соматических) мутаций, в частности — транслокациями гена *RET* (10–50% всех случаев заболевания), а также мутациями *Ras* (около 12% случаев ПРЩЖ).

Перестройка *RET/PTC* — первый генетический дефект, известный при папиллярном РЩЖ, он известен с 1990 года. Ген *RET* кодирует экспрессируемый в нейроэндокринных клетках рецептор тирозинкиназы для фактора роста, происходящего из глиальных клеток.

Существенной проблемой оценки роли любого полиморфизма *RET* является его неоднородная представленность в отдельных популяциях. Можно упомянуть результаты [19], которые на основании типирования *RET* провели анализ 10 различных гаплотипов этого гена и выявили преобладание одного из них при папиллярной карциноме ЩЖ во французской и итальянской выборках, тогда как другой гаплотип был информативен лишь во французской группе больных. Таким образом, диагностическая значимость генотипа *RET* изучена недостаточно и требует дальнейшего исследования в различных популяциях.

К настоящему времени в папиллярном раке идентифицировано более 8 химерных *RET/PTC* генов, при этом в 80% случаев речь идет о *RET/PTC-1* и *RET/PTC-3*. Перестановка *RET/PTC* специфична для папиллярного РЩЖ и встречается с достаточно высокой частотой (30–65%) при радиационно-индуцированном раке (особенно черномыльском) и достаточно редко (5–15%) — при спорадическом раке [11, 20].

Папиллярные тиреоидные карциномы, экспрессирующие *RET*, не проявляют агрессивного биологического поведения и имеют благоприятный прогноз. Недифференцированный злокачественный фенотип при

тиреоидных карциномах ассоциирован с одновременной активацией *RET* и *H-ras* или *K-ras*. Традиционно определение тактики лечения больных РЩЖ производится на основании морфологических характеристик опухолевого процесса [19, 21].

В дальнейшем, в 2002 году был описан целый ряд соматических генных aberrаций и, в особенности, — мутация гена *BRAF V600E*. Это — соматическая точечная мутация экзона 15 гена *BRAF*, который кодирует одну из киназ семейства *RAF*. Клинические исследования показывают, что эта мутация не только инициирует канцерогенез в нормальной популяции фолликулярных клеток щитовидной железы, но и способствует прогрессии ПРЩЖ, повышенному риску лимфо- и гематогенного метастазирования и смертности больных [22].

Данный ген считается одним из ключевых факторов канцерогенеза при целом ряде неоплазий. В частности, показана особая роль мутации *BRAF* в патогенезе папиллярного рака щитовидной железы, и на сегодняшний день эта мутация расценивается как наиболее распространенный молекулярный дефект (39–69%) при спорадическом папиллярном РЩЖ и, напротив, редкий при радиационно-индуцированном папиллярном РЩЖ [23]. В последние годы диагностика мутаций *BRAF* и *RET* начинает внедряться и в отечественной онкохирургии [24]. В СПбГМУ определение *BRAF* также используется в практике эндокринной хирургии [25]. Авторы используют для исследования образцы тонкоигольных биоптатов (ТАБ) и проводят определение *BRAF V600E* посредством рутинной или *real-time* ПЦР. Предварительные результаты, полученные при обследовании 94 пациентов в СПбГМУ, свидетельствуют о 100%-ной специфичности и высокой чувствительности данного генного маркера для уточняющей диагностики папиллярного рака ЩЖ, что позволяет более рационально планировать хирургическое лечение при наличии данной генной мутации.

Подобная диагностика, однако, имеет существенные ограничения в случаях папиллярного РЩЖ, возникающего в детском возрасте, поскольку мутации *BRAF* в этой ситуации встречаются исключительно редко. Как при радиационно-индуцированном, так и при спорадическом папиллярном РЩЖ обнаруживаются перестановки *RET/PTC*. Это свидетельствует о том, что возраст является ещё одной важной детерминантой онкогенного процесса в тиреоцитах [12, 26, 27].

Одним из наиболее изученных генов в плане развития опухолей является ген *p53*. Считается, что мутации данного гена облегчают малигнизацию клеточных клонов за счет снижения их естественной гибели (апоптоза). В работе Granja et al. [28] показана повышенная частота данного генного варианта при фолликулярных и папиллярных раках ЩЖ.

Нормальные тиреоидные клетки при воздействии на них ионизирующей радиации, ультрафиолетового облучения и других факторов отвечают увеличением

экспрессии p53 и, таким образом, не происходит патологической клеточной пролиферации. Напротив, клетки, несущие мутантные p53, при воздействии определенных влияний отвечают усиленным делением и способны к аккумуляции генетических дефектов, характерных для канцерогенеза. Мутации p53 чаще всего обнаруживаются на поздних стадиях рака ЩЖ, а сочетание их с активацией *gas* свидетельствует о повышенной агрессивности рака. Частота встречаемости мутаций p53 различна в различных географических зонах и может быть связана с наличием или отсутствием йодного дефицита. Так, в регионах с йодным дефицитом мутации p53 распространены в большей степени [6, 29].

Кроме того, существенная роль в канцерогенезе может быть связана с генетической вариабельностью системы репарации ДНК, что было показано в популяциях лимфоцитов у больных с РЩЖ [30].

Анализ мутаций в генах H-, K- и N-*gas* проводился в образцах опухолей с различной гистологией и степенью анаплазии. Чаще всего точечные мутации *gas*-онкогенов наблюдаются в химически индуцированных раках в эксперименте. Считается, что в клетках ЩЖ только *gas*-мутаций недостаточно для раковой трансформации, и они играют роль во взаимосвязи с ростовыми факторами, что подтверждается обнаружением *gas*-активирующих мутаций в нормальной тиреоидной ткани, окружающей опухоль. Частота мутаций *gas*-онкогенов очень вариабельна, что не позволяет ее использовать в прогностических целях, и зависит от йодной обеспеченности, воздействия канцерогенных веществ, облучения [11].

Ядерные белки с-тус представляют собой факторы, регулирующие транскрипцию генов. Различные нарушения структуры с-тус обнаруживаются при различных опухолях и, в частности, при раке щитовидной железы [31].

Однако, несмотря на доказанную прогностическую значимость экспрессии генов RET, BRAF и ряда других генетических маркеров, определение индивидуального прогноза заболевания при РЩЖ остается не до конца решенной проблемой, так как данные генетические маркеры определяются у части больных и лишь в некоторой степени определяют агрессивность опухоли (темпы роста, метастазы). Это делает актуальным поиск дополнительных генетических критериев, отражающих взаимодействие нормальных и опухолевых клеток в условиях развития злокачественного заболевания и ассоциированных с клиническими признаками агрессивного течения.

Нарушения экспрессии генов при неоплазиях щитовидной железы

В качестве наиболее существенного события в генезе папиллярного РЩЖ рассматривается активация сигнального пути RET/RAS/BRAF/MAPK [18].

В связи с этим в клетках РЩЖ проводится оценка экспрессии генов, среди которых, возможно, удастся найти и диагностически актуальные маркеры.

В частности, микрочиповые методы с одновременной регистрацией уровней мРНК многих десятков и сотен генов позволяют определять спектры экспрессии, специфичные для различных гистотипов РЩЖ, прогноза метастазирования и ответа на цитостатическую терапию.

Так, проводилось полногеномное исследование генной экспрессии с целью сравнения соответствующих спектров клеток ПРЩЖ с мутацией BRAF и без нее, а также в нормальных клетках ЩЖ [18]. При тестировании экспрессии 539 отдельных генов 17 имели значительно повышенную активность, ассоциированную с наличием мутации BRAF. Активация касалась, главным образом, генов, имеющих отношение к ремоделированию внеклеточного матрикса, адгезии, миграции, инвазии и метастазированию клеток. Эти гены можно характеризовать как регуляторы клеточного цикла, адгезии клеток, механизмов воспаления и иммунитета, цитокинового ответа, активации рецептора EGF (фактора роста эпителия), эстроген-зависимой передачи сигнала, механизмов взаимодействия с убикитином, каспазной цепи и агрегации тромбоцитов.

Другой обширный мета-анализ экспрессии генов при РЩЖ показал, что некоторые хорошо известные гены, участвующих в канцерогенезе и прогрессии опухоли, существенно активированы в тканях злокачественных новообразований ЩЖ [32]. Среди них — гены, контролирующие различные этапы протеолиза, связанные с лизисом внеклеточного матрикса и инвазией опухоли, такие, как *SERPINA1*, *TIMP1*. Таким образом, целесообразно изучать далее уровни повышения экспрессии этих и других генов-кандидатов в биологические маркеры опухолевых новообразований.

Исследования множественной экспрессии генов методом биочипов выявили группы транскриптов, которые можно использовать для диагностики злокачественно измененных тканей ЩЖ, в дополнение к обычной цитологической диагностике [33]. На первом этапе авторы выявили 75 генов, активация которых может дифференцировать злокачественные тиреоидные клетки от доброкачественных новообразований. Далее, с применением количественной ПЦР выявлены три наиболее информативных гена (*HMG2*, *MRC2* и *SFN*), совместный анализ которых обеспечивал специфичность до 84% при чувствительности 71%. Следует отметить, что аналогичная оценка этих факторов методом иммунохимии отличалась более высокой специфичностью (до 100%). Таким образом, поиск в этом направлении является перспективным в плане повышения точности детекции мелких очагов РЩЖ и в случаях с неопределенным диагнозом.

Частые генные полиморфизмы как факторы риска РЩЖ

Как известно, в геноме человека существуют сотни генных вариантов, которые могут повышать риск появления и прогрессии различных онкологических заболеваний. В этом плане имеется лишь несколько крупных полногеномных исследований ассоциаций РЩЖ с кон-

кретными областями генома. В списке потенциальных генов предрасположенности к злокачественным новообразованиям ЩЖ сейчас насчитываются и несколько генов, имеющих отношение к целостности и стабильности генома [34]. В аспекте повышенного риска развития папиллярного рака ЩЖ чаще всего рассматривают полиморфные варианты генов системы детоксикации, а также генов, контролирующих процессы репарации ДНК в клетках [35]. Кроме того, ввиду все большего значения, которое придается ремоделированию внеклеточного матрикса при опухолевых и воспалительных процессах, обращают внимание и на функциональные полиморфизмы генов, контролирующих протеолиз межклеточного вещества. В частности, мы провели исследование ассоциации между клиническими особенностями папиллярного рака ЩЖ и функциональными вариантами генов матриксных металлопротеиназ (ММР-1, ММР-3, а также гена ACE). В частности, нами выявлено, что генотип 5 А/5 А ММР-3 связан с ранним дебютом заболевания (на 10 лет раньше, чем у остальных пациентов), тогда как носительство аллеля D гена ACE-1 ассоциировано с ранним дебютом заболевания и большими размерами опухоли [36]. В целом, пожилой возраст, мужской пол, размер опухоли более 2 см, наличие генотипа DD гена ACE-I или сочетание генотипа 5 А гена ММР3 с аллелем D гена ACE-1 являются существенными факторами, ассоциированными с неблагоприятным течением заболевания. Это исследование пока носит предварительный характер и требует подтверждения на больших выборках пациентов.

Заключение

Перечисленные выше генные факторы играют существенную роль на различных этапах развития, прогрессии и метастазирования злокачественных новообразований щитовидной железы. Хотя практическое применение этих знаний ограничено в настоящее время (за исключением мутаций BRAF и RET), последующие исследования могут определять эти или другие маркеры потенциальной злокачественности индивидуальных опухолей. В частности, определение генных вариантов металлопротеиназ позволит получить представление о реальном состоянии опухолевой прогрессии и выявить группы с агрессивным течением опухолевого процесса.

Таким образом, в настоящий момент, с учетом современных взглядов на этиопатогенез дифференцированного рака ЩЖ, а в частности, папиллярного рака ЩЖ, клинические критерии диагноза и прогноза рака ЩЖ все чаще дополняются гормональными показателями и молекулярно-генетическими маркерами [37]. Среди биологических маркеров злокачественности опухолей ЩЖ наиболее реальными для внедрения являются соматические мутации (например, гена BRAF), которые возникают на протяжении жизни человека и являются причиной злокачественной трансформации

тиреоидных клеток. Не исключено, что среди генов, активно экспрессируемых в опухолях ЩЖ, будут выявлены такие, которые будут указывать на тип опухоли и/или степень ее прогрессии.

Литература

1. Пачес А. И., Пронн Р. М. Рак щитовидной железы. М.: Медицина, 1984: 320.
2. Stein M., Lachter J., Bartal A. et al. Thyroid cancer and multiple primary malignancies in Israel // J. Surg. Oncol. 1991; 47 (4): 221–224.
3. Колосюк В. А. Первично-множественные опухоли у больных раком щитовидной железы: Дис. ... канд. мед. наук. СПб., 1999: 23.
4. Романчишен А. Ф. Клинико-патогенетические варианты новообразований щитовидной железы. СПб: Наука, 1992: 258.
5. Machens A., Dralle H. Multiple endocrine neoplasia type 2: achievements and current challenges // Clinics. 2012; 67 (S1): 113–118.
6. Nishida T., Nakao K., Hamaji M. et al. Overexpression of p53 protein and DNA content are important biologic prognostic factors for thyroid cancer // Surgery. 1996; 119 (5): 568–575.
7. Baris O., Mirebeau-Prunier D., Savagner F. et al. Gene profiling reveals specific oncogenic mechanisms and signaling pathways in oncocytic and papillary thyroid carcinoma // Oncogene. 2005; 24: 4155–4161.
8. Pathwardhan N. A., Cataldo T., Braverman L. E. Surgical management of the patients with papillary cancer // Surg. Clin. North Am. 1995; 75 (3): 449–464.
9. Kurozumi K., Nakao K., Nishida T. et al. Significance of biologic aggressiveness and proliferating activity in papillary thyroid carcinoma // World J. Surg. 1998; 22 (12): 1237–1242.
10. Cooper D. C., Schneyer C. R. Follicular and Hurtle cell carcinoma of the thyroid // Endocr. Metab. Clin. North Am. 1990; 19 (3): 577–591.
11. Giordano T. J., Quirk R., Thomas D. G. et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis // Oncogene. 2005; 24: 6646–6654.
12. Melillo R. M., Castellone M. D., Guarino V. et al. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells // J. Clin. Invest. 2005; 115: 1068–1081.
13. Riesco-Eizaquirre G., Santisteban P. Molecular biology of thyroid cancer initiation // Clin. Transl. Oncol. 2007; 9 (11): 686–693.
14. Sobrinho-Simoes M., Preto A., Rocha A. S. et al. Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas // Virchows Arch. 2005; 447: 787–793.
15. Siironen P., Louhimo J., Nordling S. et al. Prognostic factors in papillary thyroid cancer: an evaluation of 601 consecutive patients // Tumour Biol. 2005; 26 (2): 57–64.
16. Tonacchera M., Vitti P., De Servi M., Agretti P., De Marco G., Chiovato L., Pinchera A. Gain of function TSH receptor mutations and iodine deficiency: implications in iodine prophylaxis // J. Endocrinol. Invest. 2003; 26 (2 Suppl): 2–6.
17. Fuhrer D., Lewis M. D., Alkhafaji F. et al. Biological activity of activating thyroid-stimulating hormone receptor mutants depends on the cellular context // Endocrinology. 2003; 144: 4018–4030.
18. Nucera C., Lawler J., Hodin R., Parangi S. The BRAFV600E mutation: what is it really orchestrating in thyroid cancer? // Oncotarget. 2010; 1: 751–756.
19. Lesueur F., Corbex M., McKay J. D. et al. Specific haplotypes of the RET proto-oncogene are over-represented in patients with sporadic papillary thyroid carcinoma // J. Med. Genet. 2002; 39 (4): 260–265.

20. Chung W. Y., Shin E, Yang W. I. et al. RET/PTC and CK19 expression in papillary thyroid carcinoma and its clinicopathologic correlation // J. Korean Med. Sci. 2005; 20 (1): 98–104.

21. Kimura E. T., Nikiforova M. N., Zhu Z. et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RASBRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma // Cancer Res. 2003; 63: 1454–1457.

22. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications // Endocr. Rev. 2007; 28: 742–762.

23. Puxeddu E., Moretti S., Elisei R. et al. BRAF (V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004; 89 (5): 2414–2420.

24. Румянцев П. О., Залетаев Д. В., Васильев Е. В., Саенко В. А., Ильин А. А., Румянцева У. В., Абросимов А. Ю., Медведев В. С. Анализ частоты соматических мутаций генов BRAF и RET в папиллярном раке щитовидной железы // Вопросы онкологии. 2006; 52 (2): 145–149.

25. Семенов Д. Ю., Борискова М. Е., Зарайский М. И., Сабурова И. Ю., Панкова П. А., Фарафонова У. В., Быков М. А. Использование мутации BRAF V600E в дифференциальной диагностике фолликулярных опухолей и папиллярного рака щитовидной железы и оптимизации тактики лечения // Вопросы онкологии. 2012; 58 (5): 649–652.

26. Trovisco V., Vieira de Castro I., Soares P. et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma // J. Pathol. 2004; 202 (2): 247–251.

27. Nikiforova M. N., Stringer J. R., Blough R. et al. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells // Science. 2000; 290: 138–141.

28. Granja F., Morari J., Morari E. C. et al. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer // Cancer Lett. 2004; 16 (210): 151–157.

29. Kunz C., Pebler S., Otte J. Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53 // Nucleic Acids Res. 1995; 23: 3710–3717.

30. García-Quispes W. A., Pastor S., Galofré P., Biarnés F., Castell J., Velázquez A, Marcos R. Influence of DNA-repair gene variants on the micronucleus frequency in thyroid cancer patients // Mutat. Res. 2013; 750: 34–39.

31. Shih A., Davis F. B., Lin H. Y., Davis P. J. Resveratrol induces apoptosis in thyroid cancer cell lines via a MAPK- and p53-dependent mechanism // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002; 87 (3): 223–232.

32. Griffith O. L., Melck A., Jones S. J., Wiseman S. M. Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers // J. Clin. Oncol. 2006; 24 (31): 5043–5051.

33. Prasad N. B, Kowalski J., Tsai H. L., Talbot K., Somervell H., Kouniavsky G. et al. Three-gene molecular diagnostic model for thyroid cancer // Thyroid. 2012; 22: 275–284.

34. Neta G., Brenner A. V., Sturgis E. M. et al. Common genetic variants related to genomic integrity and risk of papillary thyroid cancer // Carcinogenesis. 2011; 32: 1231–1237.

35. Li J., Long J., Hu Y., Tan A., Guo X., Zhang S. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and thyroid cancer risk: a meta-analysis // Cancer Epidemiol. 2012; 36 (6): 333–340.

36. Романчишен А. Ф., Богатинов А. А., Кузьмичев А. С., Чухловин А. Б., Морозова Е. Б., Тотолян А. А. Клиническая значимость функциональных вариантов генов матричных металлопротеиназ при раке щитовидной железы // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. 2009; 1: 57–60.

37. Берштейн Л. М. Рак щитовидной железы: эпидемиология, эндокринология, факторы и механизмы канцерогенеза // Практик. онкология. 2007; 8 (1): 1–8.



**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: akvatest@mail.ru

**ОНКОПАСПОРТ-СКРИНИНГ — СИСТЕМА СТАНДАРТИЗИРОВАННОЙ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ГЕНОВ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГРУПП НАСЕЛЕНИЯ С ПОВЫШЕННЫМ РИСКОМ
РАЗВИТИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

**М. И. ЗАРАЙСКИЙ, Е. Е. ЗУЕВА, А. Б. ЧУХЛОВИН, Д. В. ЧЕРЕДНИЧЕНКО, Е. Б. МОРОЗОВА,
О. В. ГАЛКИНА, А. С. БЕЛТЮКОВА, М. В. ГОРЧАКОВА, И. Ю. САБУРОВА,
А. В. АРТЕМЬЕВА, К. Ю. СЛОБОДНЮК, Е. Б. РУСАНОВА, М. В. ИВАНЧЕНКО,
М. Е. БОРИСКОВА, У. В. ФАРАФОНОВА, М. А. БЫКОВ, Д. Ю. СЕМЕНОВ**
ГБОУ ВПО СПбГМУ имени акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ

***Резюме.** В статье отражены основные принципы работы новой тест-системы «Онкопаспорт-скрининг», разработанной для поиска малоклеточных популяций клеток с мутациями в основных генах, определяющих развитие опухолевого процесса. Соматические мутации выявлялись в генах клеточных рецепторов к ростовым факторам (ERBB2, EGFR, FGFR3), генах внутриклеточного сигналинга (PIK3CA, RAS, BRAF), факторе транскрипции (GATA3) и гене апоптоза (p53). С помощью данной системы протестирован биологический материал (кровь и биоптаты тканей) основных социально значимых опухолей систем гемопоэза, щитовидной железы, рака шейки матки, кишечника, молочной железы и легких.*

Для использования в широкой клинической практике тест-система была адаптирована к отечественному оборудованию, а также разработан ряд молекулярно-генетических методик, позволяющих повысить чувствительность и пропускную способность диагностического процесса. Показан характер поражения основных генетических систем, специфичный для опухолей различного происхождения.

***Ключевые слова:** тест-система, «Онкопаспорт-скрининг», мутация, опухолевой процесс, система гемопоэза, щитовидная железа, шейка матки, кишечник, молочная железа, легкие.*

**ONCOPASSPORT-SCREENING. THE SYSTEM OF STANDARDIZED MOLECULAR GENETIC
CHARACTERISTICS OF GENES EVALUATION FOR SCREENING OF THE POPULATION
GROUPS WITH THE INCREASED RISK OF MALIGNANCIES**

**M. I. ZARAIISKI, E. E. ZUEVA, A. B. CHUKHLOVIN, D. V. CHEREDNICHENKO,
E. B. MOROZOVA, O. V. GALKINA, A. S. BELTUKOVA, M. V. GORCHAKOVA, I. JU. SABUROVA,
A. V. ARTEMJEVA, K. JU. SLOBODNUK, E. B. RUSANOVA, M. V. IVANCHENKO,
M. E. BORISKOVA, U. V. FARAFONOVA, M. A. BIKOV, D. JU. SEMENOV**
State budget educational institution of higher professional education
“Saint-Petersburg State Pavlov Medical University” Ministry of Health Care of Russian Federation

***Summary.** The article discusses the main principles of new test system “Oncopassport-screening”. This system was worked out for screening of pauci-cellular populations of cells with mutations of main genes, which determine the development of malignancy. Somatic mutations are revealed in genes encoding cellular receptors to growth factors (ERBB2, EGFR, FGFR3), genes of intracellular signalling (PIK3CA, RAS, BRAF), transcription factor (GATA3) and apoptosis gene (p53). This test was used for biological material (blood and tissue biopsy samples from main socially important tumors of hemopoiesis system, thyroid gland, uterus cancer, intestinal cancer, mammal gland cancer and lung cancer. In order to be used in wide clinical practice test-system was adopted to Russian equipment. Several molecular genetic methods are worked out in order to improve sensitivity of diagnostic process and increase number of tests.*

The article discusses the character of affection of the main genetic systems specific for tumors of different origin.

***Key words:** test system, «Oncopassport-screening», mutation, tumor development process, hemopoiesis system, thyroid gland, uterus, intestine, mammal gland, lungs.*

Данные для корреспонденции:

Зарайский Михаил Игоревич, д. м. н., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ГБОУ ВПО СПбГМУ имени акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, e-mail: mzaraiski@yandex.ru

Введение

Общеизвестно, что множество факторов внешней среды может способствовать злокачественной трансформации клеток, а также подавлять функции иммунологического надзора, препятствующие размножению опухолевых клонов [1]. Так, например, при изучении последствий крупных радиационных аварий были выявлены лейкемогенные эффекты гамма-излучения у лиц, выживших после ядерных взрывов, и повышение частоты новообразований щитовидной железы после аварии Чернобыльской АЭС [2]. Патогенный, дозозависимый эффект этих факторов доказан и требует учета в качестве существенного фактора развития злокачественных новообразований. То же касается и многих других канцерогенных химических воздействий, включая ряд цитостатических медицинских препаратов, которые при введении оказывают мощное мутагенное действие на нормальные клетки организма, вызывая вторичные злокачественные заболевания [3]. Эффекты мутагенных и канцерогенных факторов внешней среды — отдельная и очень важная область экспериментальной онкологии и онкоэпидемиологии.

По данным Популяционного ракового регистра только в Санкт-Петербурге ежегодно регистрируется более 18 000 больных с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования. Это один из самых высоких в России уровней онкологической заболеваемости. Примерно треть пациентов — это молодые люди, у которых онкологическое заболевание диагностируется в 3-й стадии развития. На этой стадии даже правильно подобранная терапия не всегда оказывается эффективной. Одним из решений проблемы является ранняя диагностика онкологических заболеваний (ОЗ) на основе оценки мутационного статуса генов, определяющих основные иницирующие механизмы опухолевой трансформации клеток. Подобные обследования в группах биологического и социального риска по стандартному клинико-лабораторному протоколу помогут клиницистам выявлять ОЗ на доклиническом этапе.

Целью настоящей работы была разработка информативной системы комплексной молекулярно-генетической оценки мутационного повреждения генов, определяющих ранние этапы развития ОЗ.

Материалы и методы

Характеристика материала для исследования приведена в таблице 1.

Все пациенты обследовались на базе Центра лабораторной диагностики СПбГМУ им. И. П. Павлова. В исследовании были включены пациенты с верифицированными диагнозами.

Выделение геномной ДНК из биологических образцов проводили с использованием набора «ДНК — ГС» (ДНК-Технология, Россия) согласно инструкции производителя. В результате получали 100 мкл водного раствора, содержащего от 3 до 10 мкг ДНК. После выделения образцы ДНК хранились при температуре -20 °C до исследования.

Проведение ПЦР анализа

Аmplификация проводилась на приборе «DTLite» (ДНК-технология, Россия) в режиме реального времени (RealTime) по двухпраймерной схеме в присутствии интеркалирующего красителя EVAGreen (Синтол, Россия). Специфические последовательности праймеров приведены в таблице №2. Реакционные смеси с праймерами были раскапаны в два 8-луночных ПЦР стрипа (по 0,2 мл) по следующей прописи:

Стрип 1: ERBB2, EGFR, PIK3CA, KRAS, GATA3-5, GATA3-6-1, GATA3-6-2, BRAF

Стрип 2: TP53-5-1, TP53-5-2, TP53-7, контроль ПЦР-смеси (без праймеров).

Общий амплификационный протокол был следующий:

Цикл №	Температура	Повтор
1	95 °C — 5 мин	1 цикл
2	95 °C — 15 сек, 61 °C — 30 сек	40 циклов
3	95 °C — 2 мин, 40 °C — 2 мин	1 цикл
4	От 65 °C до 95 °C — 0,1 °C — по 4 сек	300 циклов

На 4-м цикле амплификации был реализован протокол высокоразрешающей кривой плавления (ВКП) для выявления патологических пиков, соответствующих наличию мутации в исследуемом гене или его фрагменте.

Таблица 1. Характеристика лабораторного материала для исследования

№ п/п	Нозологическая форма	Пациенты	Гистологические блоки
1	Острые лейкозы	300	—
2	Рак щитовидной железы	130	170
3	Рак шейки матки	120	150
4	Рак молочной железы	—	210
5	Рак легких	—	170
6	Рак кишечника	—	160

Таблица 2. Последовательности праймеров, включенных в исследование

Ген	Экзон	Праймер прямой	Праймер обратный
ERBB2	2	ACATGGGTGCTTCCCATTCC	GTCCTTGGTCCCTTCACCTA
EGFR2	2	CAGCAGGGTCTTCTCTGTTTC	GAAATGCTGGCTGACCTAAAG
PIK3CA	10	ATCCAGAGGGGAAAAATATGAC	TGAGATCAGCCAAATTCAGTTAT
KRAS	2	GTGACATGTTCTAATATAGTCACATTTTC	GGTCCTGCACCAGTAATATG
BRAF	15	AGATCTACTGTTTTCTTTACTTACTACACC	AATCAGTGGAAAAATAGCCTCAATTCT
GATA3	5	GATTTCACCCTCTCCTCTCTCCC	AGCCCTGTTCTTGCTGATCC
GATA3	6-1	GTGGAACCCTTCTTGGTGTG	AGTCCTCCAGTGAGTCATGC
GATA3	6-2	AAATGTCTAGCAAATCCAAAAAGTGCAA	GTGGTCAGCATGTGGCTGGA
TP53	5-1	GCCCTGACTTTCAACTCTG	CCTCACAACCTCCGTCAT
TP53	5-2	TGGCCATCTACAAGCAGTC	CAGCCCTGTCGTCTCTC
TP53	7	GGCGCACTGGCCTCATCT	AGAGGCTGGGGCACAGCA

Постамплификационный этап

В результате амплификации получались кривые накопления интеркалирующего красителя в каждой пробирке (рис. 1).

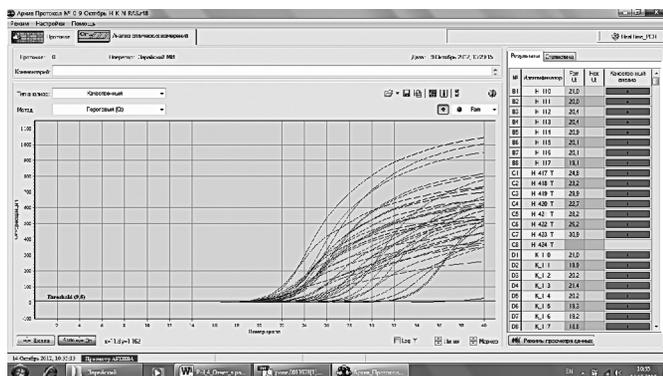


Рис. 1. Фрагмент протокола ПЦР

После проведения ВКП получали диаграммы (рис. 2), соответствующие накоплению в пробирке специфических нормальных (рис. 3) и мутированных (рис. 4) продуктов ПЦР.

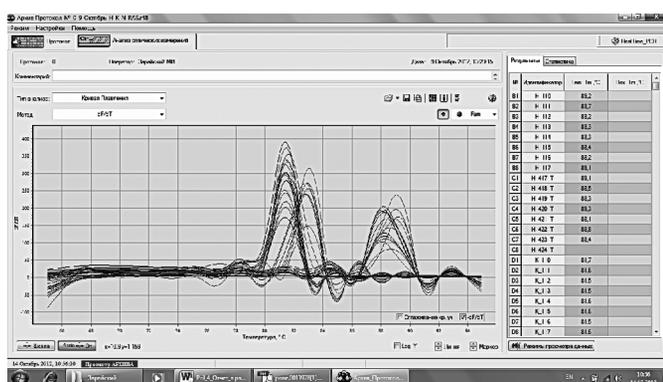


Рис. 2. Фрагмент протокола ВКП

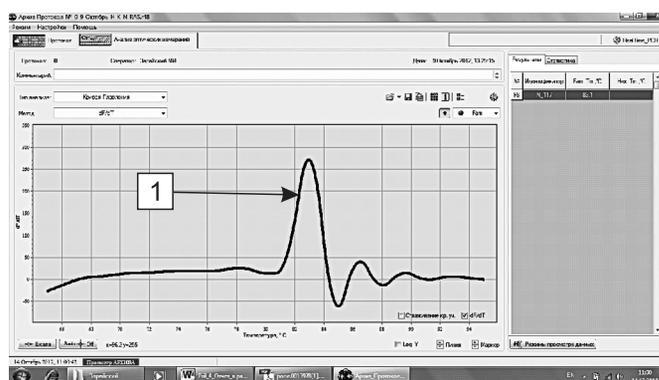


Рис. 3. Фрагмент протокола ВКП – норма (1)

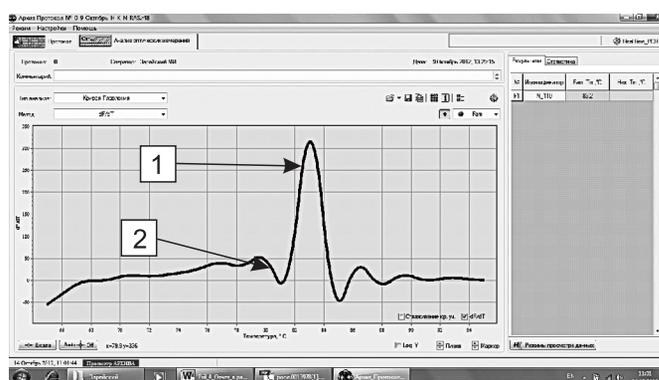


Рис. 4. Фрагмент протокола ВКП – норма (1) и мутация (2)

Результаты

В таблице 3 показаны выявленные генетические нарушения генов, характерные для различных нозологических форм опухолей. Цифры в таблице указывают встречаемость мутации в процентах к общему числу пациентов по нозологии.

Таблица 3. Встречаемость мутаций в исследуемых генах при опухолях различного происхождения

	ОЛ	РЩЖ	РШМ	РМЖ	РЛ	РК
ERBB2	0	0	0	82,9	0	83,8
EGFR	0	0	0	0	84,7	88,8
PIK3CA	0	0	0	67,8	80,6	81,9
KRAS	0	66,3	52,5	0	0	57,5
BRAF	0	57,7	0	0	0	42,5
GATA3	42,7	0	0	64,3	49,4	58,1
TP53	0	54,7	56,7	69,5	59,4	56,3

Примечание: ОЛ — острые лейкозы, РЩЖ — рак щитовидной железы (папиллярный), РШМ — рак шейки матки, РМЖ — рак молочной железы, РЛ — рак легких, РК — рак кишечника.

Необходимо отметить, что мутационные повреждения гена TP53 встречаются практически при всех типах исследуемых опухолей, в то время как поражения генов BRAF и EGFR более специфичны для рака щитовидной железы и рака кишечника, соответственно.

В отношении нозологий прослеживается следующая картина — при раке кишечника повреждаются практически все исследуемые гены, а при остром лейкозе только транскрипционные факторы.

Выявление у пациентов специфических генетических маркеров — мутаций является достоверным диагностическим маркером наличия различных типов ОЗ. Полученные результаты частично совпали с литературными данными. Расхождения могут быть связаны с малой выборкой.

Критерии достоверности метода были вычислены по общепринятой методике. Таким образом, чувствительность предлагаемых методов исследования составила 76%, специфичность — 100% и, соответственно, диагностическая ценность составила 89%.

Обсуждение

Исследованные в данной работе гены относятся к разным классам белков. Это белки межклеточного взаимодействия, тирозинкиназы, белки внутриклеточного сигналинга, транскрипционные ядерные факторы. Все эти белки крайне важны для правильного функционирования любой клетки организма. Перечень исследуемых генетических структур выбран не случайно. Дело в том, что любая клетка организма, в том числе и являющаяся мишенью для опухолевой трансформации, регулируется по определенным правилам.

Ген ERBB2

ErbB рецепторы изначально были определены на основании их онкогенного потенциала [4]. Благодаря их вовлечению в механизм онкогенеза были изучены структура и механизмы активации рецепторов ErbB. Связывание лиганда с внеклеточным доменом рецепторов ErbB способствует димеризации рецептора и активации внутриклеточного домена тирозинкиназы [5]. Активирован-

ные рецепторы фосфорилируются друг с другом по ряду остатков тирозина и запускают дальнейший внутриклеточный путь передачи сигнала. ErbB рецепторы активируют различные сигнальные каскады. Среди них Ras, PI3K/Akt и другие пути. Активация этих путей вызывает, по отдельности или совместно, такие клеточные реакции, как пролиферация, дифференцировка, подвижность и выживаемость клеток. Сигнальные каскады, которые действуют на выходе ErbB рецепторов, были проанализированы в первую очередь в культуре фибробластов, эпителиальных клеток и клеток карциномы (молочной железы и кишечника). Таким образом, нахождение мутаций в этом гене характерно для этих заболеваний.

Ген EGFR

EGFR является геном рецептора тирозинкиназы. Его концентрация появляется в высоком уровне на поверхности многих эпителиальных опухолей (легких, кишечника и т. д.) и активируется с помощью различных лигандов, главным образом альфа-фактором роста и фактором роста эпидермиса [6]. Взаимодействие рецептора EGFR с лигандом индуцирует гомо-или гетеродимеризации, что приводит к активации внутриклеточного домена тирозинкиназы. Активация рецепторов регулируют пролиферацию, дифференцировку и выживание клетки [7]. Учитывая их важную роль в росте опухоли, инвазии и метастазировании, EGFR сигнальный путь в настоящее время рассматривается для терапевтических целей.

Ген PIK3CA

Клиническая значимость мутаций в гене PIK3CA изучается несколько последних лет, особенно в контексте колоректального рака. Однако другие исследователи показали, что данные мутации играют также важную роль в развитии других раков — в том числе молочной железы, головного мозга, желудка и легких. Последующие исследования выявили похожие мутации в этих и многих других типах опухолей.

Ген PIK3CA кодирует p110 α , основную каталитическую субъединицу PI3K α . Из пяти p110 α областей,

мутации были первоначально найдены в адаптер-связывающем домене, С2, спиральном домене и домене киназы [8].

Ген KRAS

Белок KRAS — это внутриклеточная GTPаза, которая является центральным посредником рецептора эпидермального фактора роста. Повышение EGFR — KRAS сигналинга сопровождается опухолевой прогрессией при колоректальном канцерогенезе. Мутации KRAS приводят к потере GTPазной активности, следовательно, активируют ее конституитивно. KRAS мутации встречаются в 30–60% случаев колоректального рака. Корреляция между KRAS мутациями в первичной опухоли и развитием метастазов высока. Ряд ученых также указывают на значимость мутаций в гене KRAS при опухолях щитовидной железы и раке шейки матки.

Ген GATA3

GATA — транскрипционный фактор, координирует клеточное созревание с арестом пролиферации и выживания клеток. Таким образом, роль этого гена в раковых опухолях человека крайне высока. Среди наиболее заметных примеров — структурные мутации в GATA1, которые находятся почти во всех мегакариобластных лейкозах, у больных с недифференцированным раком молочной железы, толстой кишки и раком легких.

Ген p53

По мнению большинства исследователей, центральную роль в инициации и развитии апоптоза играет белок TP53 (Tumor Protein 53). Данный белок, обладающий выраженной опухольсупрессорной активностью, представляет собой ядерный фосфопротеин, который играет одну из центральных ролей в ответе клетки на повреждение, регуляции клеточного цикла, а также в предотвращении накопления в организме аномальных клеток.

В основе патогенеза большинства ОЗ лежит механизм опухолевой трансформации клетки-мишени, одним из следствий которого является нарушение регуляции процессов апоптоза. Снижение апоптотической активности создает благоприятные условия для накопления в организме опухолевых клеток.

Одним из основных механизмов снижения уровня апоптоза является инактивация опухольсупрессорного белка TP53 вследствие мутаций различной локализации кодирующего данный белок гена [9]. Встречаемость мутаций в гене p53 у больных ОЗ зависит от нозологии и составляет от 10 до 70% [10]. Мутационная инактивация гена p53 строго коррелирует с комплексом кариотипических и цитогенетических нарушений, имеющих самостоятельное неблагоприятное прогностическое значение.

В настоящее время существуют две основные гипотезы, объясняющие связь мутаций гена p53 с устойчивостью к химиотерапии. Согласно первой, нормальный

(«дикий») тип гена оказывает супрессирующее действие на ген множественной лекарственной устойчивости (mdr-1), в то время как мутантный тип p53 — активирует этот ген, вызывая состояние химиорезистентности. Другая гипотеза указывает на тот факт, что некоторые химиотерапевтические препараты, такие как производные антрациклинов, цитозар и др., воздействуя на процессы репликации ДНК, инициируют процесс p53-опосредованного апоптоза.

Таким образом, выявление мутаций в гене p53 у онкологических пациентов может иметь самостоятельное клиническое значение в качестве маркера неблагоприятного прогноза заболевания. Кроме того, данные по мутагенезу гена p53 могут выступать в качестве дополнительного критерия, определяющего терапевтическую тактику ведения больного, определяя показания к ТСГК и выбор режимов кондиционирования.

Ген BRAF

В работах ряда зарубежных исследователей описывается мутация V600E в 15 экзоне гена BRAF (BRAFV600E), как наиболее часто встречающаяся при папиллярном раке ЩЖ [11]. Наличие данной мутации ведет к дестабилизации в RAF-киназном гене, что в конечном итоге приводит к активации MAP-киназного пути и повышению митотической и пролиферативной активности клетки.

При исследовании гистологического материала от больных, прооперированных по поводу рака ЩЖ, наличие BRAFV600E мутации определялось с частотой 38–69% [12]. Ряд авторов связывают наличие данной мутации в опухоли с большей агрессивностью процесса (наличие регионарных метастазов, развитие рецидива в течение 6 лет). Также в последнее время появился ряд исследований с длительным отдаленным наблюдением пациентов (до 15–20 лет), в таких исследованиях была выявлена положительная корреляция между наличием BRAFV600E мутации и более неблагоприятным прогнозом течения заболевания. По данным авторов, эта мутация также ассоциирована с большей частотой экстрагной инвазии, поражением регионарных лимфоузлов и наличием отдаленных метастазов. Авторы этих исследований делают вывод о необходимости более длительного (более 5 лет) и тщательного наблюдения пациентов, у которых выявлена BRAFV600E мутация.

Однако существуют и другие исследования, авторы которых не выявляют статистически значимой корреляции между этой мутацией и агрессивностью течения процесса. Небольшое количество работ опровергают наличие связи между BRAFV600E мутацией и прогнозом. Также рядом авторов отмечается зависимость встречаемости BRAFV600E мутации от возраста пациента. Средний возраст таких пациентов составляет 46,7 года, а пациентов без мутации — 29,5 года. Зависимости от расовой принадлежности или пола выявлено не было.

Ряд статей посвящен исследованию возможности определения BRAFV600E мутации в материале ТАБ при неясном либо неинформативном заключении цитологического исследования. На дооперационном этапе правильный диагноз удалось поставить у 76% пациентов [13]. При этом определялся только один ложноположительный результат. Чувствительность определения данной мутации в материале ТАБ составила 83%, а специфичность — 96%.

Таким образом, определение BRAFV600E мутации является перспективным исследованием для диагностики рака щитовидной железы на дооперационном этапе.

Разработанные в исследовании методики суммарно представляют единую диагностическую панель для детекции мутаций в основных генах, участвующих в ранних этапах онкогенеза при опухолевых заболеваниях различной локализации. Использование такого диагностического подхода позволяет сократить сроки при первичной диагностике опухолевых заболеваний (ОЗ). При первичном посещении пациент подвергается стандартной процедуре клинического обследования, при которой обследуется по стандартной процедуре поиска мутаций, определяющих развитие ОЗ.

При повторных обращениях обследованного пациента на фоне проводимой терапии или находящегося под наблюдением необходимо повторное назначение исследования ранее выявленной генетической аберрации. Этот маркер будет показывать на наличие остаточного опухолевого клона, сигнализируя об успешности проводимой терапии по убыванию или о начинающемся рецидиве при появлении вновь.

Заключение

Важнейшей отличительной особенностью диагностической системы «Онкопаспорт — скрининг» является и тот факт, что она может быть использована для скрининга онкологических заболеваний у людей, не ощущающих себя больными, т.е. без клинических признаков заболевания. К таким людям относятся группы с отягощенным онкологическим семейным анамнезом, члены малообеспеченных семей и т.д. Немаловажную роль играет использование разработанного алгоритма для планирования семьи в медико-генетических центрах. Диагностика генетических нарушений на стадии зародыша в семьях, где один родитель имеет ОЗ, будет играть крайне важную роль в предотвращении рождения заведомо больного ребенка.

Именно таким пациентам в первую очередь показано исследование в системе «Онкопаспорт». В случае положительного результата пациенту ставится диагноз, что позволит начать раннюю эффективную терапию, не дожидаясь развития осложнений. Это, в свою очередь, позволит снизить дозовую нагрузку цитостатиков и других препаратов, оказывающих крайне вредное влияние на организм пациента, особенно в детском возрасте.

Литература

1. *Имянитов Е. Н., Хансон К. П.* Молекулярная онкология: клинические аспекты. СПб.: Печатный дом МАПО, 2007: 210.
2. *Kesminiene A., Evrard A. S., Ivanov V. K. et al.* Risk of thyroid cancer among chernobyl liquidators // *Radiat Res.* 2012 Nov; 178 (5): 425–36. doi: 10.1667/RR2975.1. Epub 2012 Sep 21.
3. *Sołowiej E., Kasprzycka-Guttman T., Fiedor P., Rowiński W.* Chemoprevention of cancerogenesis — the role of sulforaphane // *Acta Pol. Pharm.* 2003 Jan-Feb; 60 (1): 97–100.
4. *Bargmann C. I., Hung M. C., Weinberg R. A.* The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein // *Nature* 1986; 319 (6050): 226–30.
5. *Burgess A. W., Cho H. S., Eigenbrot C., Ferguson K. M., Garrett T. P., Leahy D. J. et al.* An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors // *Mol. Cell.* 2003; 12 (3): 541–552.
6. *Ciardiello F., Tortora G.* EGFR antagonists in cancer treatment // *N. Engl. J. Med.* 2008; 358: 1160–1174.
7. *Sibilia M., Kroismayr R., Lichtenberger B. M., Natarajan A., Hecking M. et al.* The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis // *Differentiation.* 2007; 75: 770–787.
8. *Fu Z. et al.* The iSH2 domain of PI 3-kinase is a rigid tether for p110 and not a conformational switch // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004; 432 (2): 244–51
9. *Campling B. G., el-Deiry W. S. et al.* Clinical implications of p53 mutations in lung cancer // *Methods molecular medicine.* 2003; 75: 53–77.
10. *Fenaux P., Preudhomme C., Quiquandon I. et al.* Mutations of the P53 gene in acute myeloid leukaemia // *British journal haematology.* 1992; 80 (2): 178–183.
11. *Namba H., Nakashima M., Hayashi T. et al.* Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2003; 88: 4393–4397.
12. *Chung K. W. et al.* Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule cytopathology diagnosis, especially in BRAFV600E mutation-prevalent area // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2006 Nov; 65 (5): 660–666.
13. *Lee J. H., Lee E. S., Kim Y. S.* Clinicopathologic significance of BRAF V600V mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis // *American Cancer Society.* 2007.

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЭЛЕМЕНТНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ИНДУКТИВНО СВЯЗАННОЙ ПЛАЗМОЙ В ДИАГНОСТИКЕ ОСТЕОПЕНИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ЛИКВИДАТОРОВ ПОСЛЕДСТВИЙ АВАРИИ НА ЧАЭС

И. Э. УШАЛ, И. И. ШАНТЫРЬ, М. В. ЯКОВЛЕВА

ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова»
МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Исследовано состояние костной ткани участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС. Проведено сопоставление показателей минеральной плотности костной ткани, биоэлементного статуса с полученной дозой внешнего облучения. Выявлен основной спектр биоэлементных показателей, находящийся во взаимосвязи с минеральной плотностью костной ткани.

Ключевые слова: ликвидаторы аварии на ЧАЭС, доза облучения, остеопения, остеопороз, биоэлементный дисбаланс, масс-спектрометрия.

BIOELEMENTS DETERMINATION BY MASS-SPECTROMETRY WITH INDUCTIVELY BIND PLASMA IN DIAGNOSIS OF OSTEOPENY IN PARTICIPANTS OF CHERNOBIL ACCIDENT LIQUIDATION

I. E. USHAL, I. I. SHANTIR, M. V. YAKOVLEVA

Federal State Budget Institution «A. M. Nikiforov All-Russia Center of emergency and radiation
medicine» Ministry of emergency situations of Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Summary. Bone tissue of Chernobyl accident liquidation participants was investigated. Such indices as mineral density and bioelements concentration were compared with the irradiation dose obtained by the patient. The main bioelements indicators related to mineral density of the bone were determined.

Key words: Chernobyl accident liquidation participants, irradiation dose, osteopenia, osteoporosis, bioelements disequilibrium, mass spectrometry.

Данные для корреспонденции:

Ушал Инна Эдвардовна, к. б. н., н. с. НИЛ элементного анализа НИО биоиндикации

ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова» МЧС России
тел.: 607-59-27, e-mail: innaushal@mail.ru

По данным исследователей, у ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС (ЛПА) остеопороз развивается чаще, чем у соответствующих групп населения [8, 9, 10, 14, 15]. В соответствии с информацией Национального регистра, заболеваемость ликвидаторов болезнями костно-мышечной системы в период 1991–1998 гг. значимо выше, чем населения в целом (соответственно, 6623 и 6500 на 10 000) [8]. В структуре общей заболеваемости ЛПА болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани занимают третье место, и на их долю приходится 13,8% [13].

В результате исследования, проведенного во ФГБУ ВЦЭРМ им. А. М. Никифорова МЧС России, остеопенический синдром выявлен у 75–83% ЛПА, проживающих в Северо-Западном регионе, со средним возрастом 45 лет [22].

Столь широкое распространение остеопенического синдрома у данной категории граждан может быть обусловлено целым рядом причин, в том числе, радиационным воздействием, нехваткой эссенциальных биоэлементов и перегрузкой организма токсическими.

Значимым, но малоизученным остается значение нарушений минерального обмена в развитии остеопенического синдрома. В то же время, для полноценного формирования и своевременного обновления костной ткани необходимо адекватное обеспечение организма всеми незаменимыми компонентами, в том числе биоэлементами в необходимых количествах и в определенном соотношении.

В целом, несмотря на несомненную роль биоэлементного дисбаланса в формировании различных патологических состояний, данные о биоэлементном «порт-

рете» ЛПА на ЧАЭС не многочисленны, а биоэлементные особенности у ЛПА на ЧАЭС при остеопеническом синдроме не изучены.

В связи с вышеизложенным, актуальной представляется цель исследования — выявить спектр биоэлементных показателей, находящихся во взаимосвязи с минеральной плотностью костной ткани (МПКТ) у ЛПА, а также оценить влияние на состояние костной ткани полученной дозы внешнего облучения и года участия в аварийно-восстановительных работах.

Материалы и методы

Обследовано 79 ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС, проживающих на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области не менее последних 5 лет. Средний возраст обследованных — 57 ± 8 лет.

Методом 2-лучевой рентгеновской абсорбциометрии у пациентов определяли МПКТ.

Содержание макро- и микроэлементов определяли в 2 биосредах: 23 элемента в сыворотке крови (Na, Mg, P, Al, Ca, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Ag, Cd, Tl, Pb, Hg, Se, I, Cs), 30 элементов в пробах волос (вышеуказанных для сыворотки крови и дополнительно В, Ве, К, Ва, Li, Мо, Fe) на квадрупольном масс-спектрометре с индуктивно связанной аргоновой плазмой (X-SERIES II ICP-MS), в соответствии с методическими указаниями [1]. Метод масс-спектрометрии позволяет одновременно определять в одной пробе содержание макро-, микро- и ультрамикроэлементов, что очень важно при оценке взаимодействия и взаимовлияния одних элементов с другими в организме человека. Несомненными достоинствами метода являются высокая чувствительность и избирательность, простота и точность калибровки по общедоступным стандартизированным образцам, относительная свобода от взаимных физических и химических влияний при анализе.

Доза внешнего облучения получена нами из базы данных Российского государственного медико-дозиметрического регистра. Одновременно фиксировался год участия в аварийно-восстановительных работах, так как радиационная и химическая обстановка вокруг реактора в 1986 году существенно отличалась от последующих лет ликвидации аварии. Среди обследованных ЛПА 56,3% принимали участие в мероприятиях по ликвидации последствий аварии в 1986 году, 32,4% — в 1987 году и 11,3 — в 1988 году. Доля ликвидаторов, получивших внешнюю дозу облучения в диапазоне 10,1–20 сЗв, со-

ставляла 11%, в диапазоне 5,1–10 сЗв — 19% и в диапазоне 0–5 сЗв — 21%.

Результаты исследований обрабатывали с помощью программного обеспечения PlasmaLab 2.5.4.

Для статистического анализа результатов использовали программы Statistica 6.0. В связи с тем, что исследуемые величины не подчиняются законам нормального распределения, использовались непараметрические методы статистического анализа.

Результаты

По результатам 2-лучевой рентгеновской абсорбциометрии пациентов разделили на три группы в зависимости от значений МПКТ: остеопороз (13 человек); остеопения (39 человек); 3-я — сравнения — нормальные значения МПКТ (27 человек).

При исследовании патологии костной системы у ЛПА важен аспект возможного влияния года участия и полученной дозы облучения на состояние костной ткани.

Для выявления возможного влияния на состояние костной ткани участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС дозы облучения и года участия был проведен корреляционный анализ с помощью непараметрических методов статистики. Результаты корреляционного анализа приведены в таблице 1.

Показатели минеральной плотности костной ткани были ниже у участвовавших в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС в 1986 году, по сравнению с участниками 1987 и 1988 годов ($r = 0,31$; $p < 0,01$). Степень выраженности остеопенического синдрома коррелирует с полученной дозой внешнего облучения ($r = 0,29$; $p < 0,05$), т. е. при более высоких полученных дозах облучения наблюдаются более низкие показатели МПКТ. Полученные данные согласуются с ранее проведенными в этом направлении исследованиями [14, 15]. Коэффициенты корреляции года участия и дозы облучения с состоянием костной ткани очень близки по значению, но достоверность корреляций МПКТ выше с годом участия, что скорее всего, связано с отсутствием неопределенности в фиксировании данного показателя, в отличие от дозы облучения, зарегистрированной в ряде случаев формально, так как далеко не все ликвидаторы были охвачены индивидуальным дозиметрическим мониторингом. Низкие значения коэффициентов корреляции, возможно, связаны с большим промежутком времени, прошедшего с момента участия в ликвидации последствий аварии

Таблица 1. Взаимосвязь МПКТ, дозы облучения и года участия

Взаимосвязь года участия и полученной дозы облучения/ анализируемый показатель	Число наблюдений	Коэффициент Спирмена R	P
Год участия/МПКТ	71	0,31	0,009
Доза облучения/МПКТ	47	-0,29	0,049

на ЧАЭС, и переходом ведущей роли в патологии к другим факторам (образ жизни, сопутствующие патологии и др.), а также неравномерностью распределения обследованных пациентов по году участия и полученной дозе облучения. Нельзя исключить, что на показатели МПКТ повлияло не только радиационное воздействие, но и весь комплекс негативных факторов, характерный для крупномасштабной аварии.

В таблице 2 сведены данные о влиянии различных факторов на минеральную плотность костной ткани.

В результате исследования установлено, что целый ряд биоэлементных показателей оказывает разнонаправленное влияние на костную ткань, причем, главным образом, МПКТ коррелирует с содержанием и соотношениями содержаний биоэлементов в сыворотке крови, а не в пробах волос. Выявлены положительные корреляции состояния костной ткани и содержания следующих эссенциальных биоэлементов в сыворотке крови обследованных: кальция, цинка и меди, которые являются функциональными антагонистами ($r = 0,39$, $p < 0,001$), при этом наблюдаются более высокие показатели МПКТ при смещении этого соотношения в сторону увеличения содержания цинка.

В то же время, установлены отрицательные корреляции между МПКТ и содержанием токсических элементов в сыворотке крови: ртути и свинца.

В ходе исследования обнаружены положительные корреляции между МПКТ и соотношением ряда эссенциальных и токсических биоэлементов в сыворотке крови: кальций/стронций, кальций/алюминий, медь/алюминий, медь/никель, цинк/алюминий, фосфор/кадмий. В практике анализа взаимосвязи биоэлементных показателей и состояния здоровья нередко важную роль играет именно соотношение содержания жизненно необходимых элементов и токсических. В некоторых случаях

сдвиг соотношений происходит раньше, чем выход за границы нормы непосредственного содержания биоэлементов. Изменение соотношений биоэлементов, в силу их антагонизма при всасывании, транспорте и участии в биохимических процессах, создает предпосылку к развитию патологических состояний.

Важны полученные нами и отмеченные многими авторами положительные корреляции между соотношениями жизненно необходимых остеотропных биоэлементов в сыворотке крови: кальций/фосфор, кальций/магний, цинк/медь. Биоэлементы, входящие в данные соотношения, являются функциональными антагонистами, поэтому для организма важно не только их абсолютное содержание, но и относительное.

Наиболее выраженная взаимосвязь минеральной плотности костной ткани прослеживается со следующими показателями биоэлементного статуса: содержанием цинка, а также соотношениями цинка и алюминия в сыворотке крови ($r = 0,42$, $p < 0,001$ и $r = 0,43$, $p < 0,001$ соответственно).

Нами получены статистически значимые умеренные корреляции между МПКТ и содержанием в сыворотке крови кальция ($r = 0,39$, $p < 0,001$), с соотношениями кальция с эссенциальными остеотропными биоэлементами — фосфором и магнием ($r = 0,31$, $p < 0,007$ и $r = 0,31$, $p < 0,008$) и соотношениями кальция в сыворотке крови с токсическими биоэлементами — стронцием ($r = 0,40$, $p < 0,001$), алюминием ($r = 0,37$, $p < 0,002$).

Обнаружена положительная достоверная взаимосвязь МПКТ и содержания меди — остеотропного биоэлемента, в сыворотке крови ($r = 0,36$, $p < 0,003$) и отрицательная взаимосвязь с содержанием токсических элементов в сыворотке крови — свинца ($r = -0,35$, $p < 0,003$) и ртути ($r = -0,29$, $p < 0,02$). Также установлена корреляционная связь МПКТ и соотношения содер-

Таблица 2. Взаимосвязь МПКТ и содержания биоэлементов в пробах волос

Взаимосвязь МПКТ/анализируемый показатель	Коэффициент Спирмена R	P
МПКТ/Ca сыв	0,39	0,000
МПКТ/Cu сыв	0,36	0,002
МПКТ/Zn сыв	0,42	0,000
МПКТ/Hg сыв	-0,29	0,010
МПКТ/Pb сыв	-0,35	0,002
МПКТ/соотношение Ca/P сыв	0,31	0,006
МПКТ/соотношение Ca/Mg сыв	0,31	0,007
МПКТ/соотношение Zn/Cu сыв	0,39	0,000
МПКТ/соотношение Ca/Al сыв	0,37	0,001
МПКТ/соотношение Ca/Sr сыв	0,40	0,000
МПКТ/соотношение Ca/Ni в пробах волос	0,23	0,047
МПКТ/соотношение Cu/Al сыв	0,31	0,006
МПКТ/соотношение Cu/Ni сыв	-0,25	0,028
МПКТ/соотношение Zn/Al сыв	0,43	0,000
МПКТ/соотношение P/Cd сыв	-0,27	0,022

жания в сыворотке крови меди и токсических элементов — алюминия ($r = 0,31$, $p < 0,007$) и никеля ($r = -0,25$, $p < 0,05$).

Практически все полученные корреляции между МПКТ и биоэлементными показателями сыворотки крови имеют среднюю значимость при высокой статистической достоверности, что говорит об адекватности их использования как дополнительного критерия при диагностике и лечении остеопороза. В то же время, накопленный опыт лаборатории свидетельствует, что при остеопеническом синдроме у женщин более информативен анализ не сыворотки крови, а проб волос. В ходе исследований у ряда пациенток выявлены следующие особенности биоэлементного статуса: превышение кальция, магния, марганца, бария в пробах волос, не обусловленное, что следует из анамнеза, приемом минеральных добавок. Пациенткам с таким биоэлементным профилем рекомендовали исследование МПКТ. В подавляющем большинстве случаев наблюдалось снижение данного показателя, в ряде случаев речь шла уже о выраженном остеопеническом синдроме — остеопорозе (потеря костной массы до 20%).

Заключение

Полученные данные позволяют сделать выводы об информативности определения биоэлементов и их соотношений, в первую очередь, в сыворотке крови, для оценки риска развития и степени тяжести остеопенического синдрома у мужчин-ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС. Для этого наиболее адекватным является метод лабораторной диагностики — масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой.

В результате исследования установлено, что к настоящему времени влияние года участия в аварийно-восстановительных работах и полученной дозы внешнего облучения невелико.

Литература

1. Антошина А. И., Павловская Н. А., Данилова Н. И. Ранняя клинико-лабораторная диагностика воздействия никеля на здоровье рабочих гальванических цехов // Мед. труда и пром. экология. 2002; 11: 13–16.
2. Барашков Г. К. Теоретические и клинические аспекты дисбаланса микроэлементов // Биомедицинская химия. 2004; 50 (1): 115–116.
3. Боев В. М. Микроэлементы и доказательная медицина. М.: Медицина, 2005: 208.
4. Лимин Б. В. [и др.]. Гигиеническая диагностика загрязнения среды обитания солями тяжелых металлов. СПб.: Изд-во С.-Петерб. гос. мед. акад., 2003: 123.
5. Горбачев А. Л. Элементный статус населения в связи с химическим составом питьевой воды // Микроэлементы в медицине. 2006; 7 (Вып. 2): 11–24.
6. Давыдов Б. И., Ушаков Б. Н. Ядерный и радиационный риск: человек, общество и окружающая среда. М.; СПб.: Фолиант, 2005: 234.
7. Ершов Ю. А. Химия биогенных элементов. М.: Высшая школа, 2000: 599.
8. Иванов В. К. [и др.]. Заболеваемость и смертность участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС: оценка радиационных рисков, период наблюдения 1992–2008 гг. // Радиационная гигиена. 2011; 4 (2): 40–49.
9. Никифорова И. Д., Шантырь И. И., Тютин Л. А. [и др.]. Заболеваемость костно-мышечной системы и минеральная плотность костной ткани у ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС // Мед. радиол. радиац. безопасн. 2000; 45 (6): 14–20.
10. Никифорова И. Д., Дрыгина Л. Б., Калинина Н. М., Зыбина Н. Н. Заболевания опорно-двигательного аппарата // Ликвидаторы последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции: патология отдаленного периода и особенности медицинского обеспечения: руководство для врачей / Под ред. С. С. Алексанина. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2008: 370–408.
11. Иванов В. Ликвидаторы. Радиологические последствия Чернобыля // Центр содействия социально-экологическим инициативам атомной отрасли, 2010: 30.
12. Алексахин Р. М. [и др.]. Крупные радиационные аварии, последствия и защитные меры. М.: ИздАТ, 2001: 752.
13. Материалы Российского Государственного медико-дозиметрического регистра / Под ред. А. Ф. Цыба, В. К. Иванова // Радиация и риск. 2008; 17 (4): 5–23.
14. Никитина Н. В. Остеопороз у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС и его коррекция альфакальциолом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. [Волгоград. гос. мед. ун-т]. Волгоград, 2005: 27.
15. Никифорова И. Д. Состояние скелета у мужчин, участвовавших в ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС: автореф. дис. ... канд. мед. наук. [Всерос. центр экстрен. и радиац. медицины МЧС России]. СПб., 1999: 15.
16. Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. СПб.: Наука, 2008: 544.
17. Скальная М. Г. Гигиеническая оценка влияния минеральных компонентов рациона питания и среды обитания на здоровье населения мегаполиса: дис. ... докт. мед. наук. М., 2004: 303.
18. Скальный А. В., Рудаков И. А. Биоэлементы в медицине. М.: Оникс 21 век: Мир, 2004: 272.
19. Скальный А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. М.: Издательский дом «Оникс 21 век»: Мир, 2004: 216.
20. Скальный А. В., Кудрин А. В. Радиация, микроэлементы, антиоксиданты и иммунитет. М.: Лир Маркет, 2000: 421.
21. Боев В. М., Быстрых В. В., Горлов А. В., Карлов А. И., Кудрин В. И. Урбанизированная среда обитания и здоровье человека. Оренбург: Печатный дом «Димур», 2004: 238.
22. Дрыгина Л. Б., Зыбина Н. Н., Давыдова Н. И., Корсакова Н. Е. Формирование остеопенического синдрома и возрастной дефицит андрогенов у мужчин-ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС // Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. 2008; 3: 46–51.
23. Шубик В. М., Романович И. К., Иванов Е. В. Влияние атомных электростанций на здоровье населения. СПб.: ФГУН НИИРГ им. проф. Рамзаева, 2006: 215.
24. Ильинских Е. Н. и [др.]. Эпидемиологическая генотоксикология тяжелых металлов и здоровье человека. Томск: Сиб. госмед. университет, 2003: 301.

ПЕРВИЧНЫЙ ИММУНОДЕФИЦИТ У ВЗРОСЛЫХ. КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

М. В. ИВАНЧЕНКО, Е. Е. ЗУЕВА

ГБОУ ВПО СПбГМУ имени акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ
Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины
Лаборатория клинической иммунологии и молекулярной диагностики

Резюме. Диагностика орфанных (редких) заболеваний традиционно рассматривается как проблема педиатрии. Действительно, большинство врожденных иммунодефицитов манифестирует в грудном и раннем детском возрасте. Однако существуют формы первичных иммунодефицитов, с которыми могут столкнуться врачи взрослой сети, прежде всего пульмонологи, отоларингологи, инфекционисты, гастроэнтерологи. Задержка установления диагноза имеет для пациентов серьезные валеологические, социальные и психологические последствия и составляет в странах ЕС в среднем около четырех лет [10]. В Российской Федерации, несмотря на возрастающий интерес к проблеме орфанных заболеваний, и первичным иммунодефицитам в частности, пациенты часто не могут получить адекватной медицинской помощи. Целью данного обзора литературы является увеличение настороженности медицинской общественности широкого спектра специальностей в отношении диагностики наиболее распространенных форм первичных иммунодефицитов у взрослых: общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН) и селективного дефицита иммуноглобулина А (СДІgА).

Ключевые слова: общая вариабельная иммунная недостаточность, селективный дефицит иммуноглобулина А, редкие заболевания, орфанные заболевания, лабораторная диагностика.

PRIMARY IMMUNE DEFICIENCY IN ADULTS. CLINICAL AND DIAGNOSTIC PECULIARITIES

M. V. IVANCHENKO, YE. E. ZUEVA

State budget educational institution of higher professional education
“Saint-Petersburg State Pavlov Medical University” Ministry of Health Care of Russian Federation
Clinical laboratory diagnosis department with a course of molecular medicine
Laboratory of clinical immunology and molecular diagnostics

Summary. The diagnostics of rare (orphan) diseases is generally considered a pediatric issue. Indeed, the majority of primary immune deficiencies (PID) manifest during infancy and early childhood. However, several forms of PID with a later onset can challenge any health profession, predominantly pulmonologists, ENT specialists, infection disease doctors, and gastroenterologists. Diagnostic delay averages 4 years in Europe and has a negative health outcome, social and psychologic consequences [10]. Despite growing interest in orphan diseases, and particularly in PID, adequate medical assistance is commonly hard to access for patients in Russia. This review is addressed to the medical community of wide-ranging qualifications to raise the awareness about the most spread forms of PID in adults, namely common variable immune deficiency and selective IgA deficiency.

Key words: common variable immune deficiency, selective IgA deficiency, rare diseases, orphan diseases, laboratory diagnostics.

Данные для корреспонденции:

Иванченко Маргарита Владимировна,
аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины
ГБОУ ВПО СПбГМУ имени акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ
тел.: 8-921-896-28-83, email: ritaiivanchenko@gmail.com

Введение

Описания клинической картины различных форм ПИД появились в 40–50 гг. XX века. Стремительное нарастание объема знаний и клинического опыта в данной области связано не только с практическими,

но и фундаментальными аспектами современной медицины. Выявление иммунологических дефектов позволяет установить функции соответствующих генов и белков в иммунных процессах в норме. В 1970-е гг. в рамках ВОЗ было сформировано отдельное сообщество, одним

из главных направлений деятельности которого являются ПИД – IUIS (International Union of Immunological Societies).

В настоящее время для выявления ПИД IUIS предлагает использовать 10 простых клинических признаков [20]:

1. Частые отиты (8 и более в течение года)*;
2. Тяжелые синуситы (два и более в течение года)*;
3. Длительное (два и более месяцев) применение антибиотиков с недостаточным эффектом*;
4. Пневмония не менее двух раз в год*;
5. Нарушение пищеварения в раннем детском возрасте;
6. Рецидивирующие глубокие абсцессы кожи или внутренних органов;
7. Персистирующий кандидоз кожи и слизистых у ребенка в течение первого года жизни;
8. Потребность во внутривенном введении антибиотиков для купирования инфекций*;
9. Не менее двух тяжелых инфекций в год (менингит, остеомиелит, целлюлит, сепсис)*;
10. Наличие семейного анамнеза, факты ранних смертей от тяжелых инфекций*.

При наличии двух и более признаков из данного перечня необходимо обследование на ПИД. Звездочкой отмечены признаки, характерные для клинической картины ОВИН.

Представители иммунологического сообщества создали регистры пациентов, которые объединяют информацию о случаях ПИД в США, странах ЕС и других, в том числе РФ. По данным Европейского сообщества по проблемам ПИД (European Society for Immunodeficiencies, ESID) за 2011 год заболевания с преимущественным дефицитом антител оказались самой обширной категорией регистра, а ОВИН (21%) и СДІgА (10,4%) – наиболее распространенными нозологиями [14]. Эксперты ESID подчеркивают, что, несмотря на возрастающую настороженность в диагностике ПИД у взрослых, отсутствует тенденция к снижению диагностической задержки ОВИН. Такая ситуация во многом объясняется постепенным характером прогрессирования заболевания: увеличением частоты госпитализаций и необходимости в серьезной терапии; диагноз часто устанавливается лишь после развития осложнений [7]. В некоторых центрах в Европе взрослые пациенты получали лечение в педиатрических отделениях в связи с административной/организационной невозможностью его проведения во взрослой сети.

Классификация ПИД пересматривается экспертами IUIS один раз в два года. Актуальная на сегодняшний день классификация была представлена в 2011 году [5]. ОВИН и СДІgА входят в группу III.2 – «преимущественные дефициты антител с существенным снижением уровней иммуноглобулинов как минимум двух классов и нормальным или низкими количествами В-клеток». В том же году ESID опубликовал пошаговый диагнос-

тический протокол ПИД для врачей широкого спектра специальностей [11]. Информация представлена в виде таблиц, которыми удобно пользоваться, в том числе, в лабораторной практике. Несмотря на существование таких протоколов, в связи с гетерогенностью клинической картины, каждый диагностический случай требует персонализированного подхода. В Санкт-Петербурге действует рабочая группа по проблемам ПИД, участники которой (иммунологи, врачи клинической лабораторной диагностики, биологи) регулярно проводят встречи-обсуждения клинических случаев и социальных вопросов.

Критерии диагноза

Исторически ОВИН была выделена как группа первичных гипогаммаглобулинемий неустановленной этиологии. ОВИН и СДІgА патогенетически весьма схожи; описаны случаи прогрессирования СДІgА в ОВИН [10, 7, 23]. Эксперты ESID и PAGID (Pan American Group for Immunodeficiency) в 1999 году [9] разделили надежность установления диагноза на три уровня: окончательный, вероятный и возможный, и предложили для каждого из них отдельные критерии. Окончательные критерии диагноза ОВИН не установлены.

Диагноз ОВИН у пациента мужского или женского пола считается

А) *вероятным* при значительном (как минимум на 2 стандартных отклонения от средних возрастных значений) снижении уровней IgG и IgA;

Б) *возможным* при значительном снижении уровней иммуноглобулинов одного из классов (IgG или IgA или IgM).

В обоих случаях необходимо соответствие трем дополнительным критериям:

1. Начало заболевания после первых двух лет жизни;
2. Отсутствие изогемагглютининов или/и нарушение ответа на вакцинацию;
3. Исключение вторичных причин гипогаммаглобулинемии (см. табл. 1).

Диагноз СДІgА у пациента мужского или женского пола старше четырех лет считается:

А) *окончательным* при уровне IgA сыворотки ниже 0,07 г/л и нормальном уровне иммуноглобулинов других классов;

Б) *вероятным* при снижении уровня IgA более чем на 2 стандартных отклонения от нормальных возрастных значений.

В обоих случаях ответ на вакцинацию по IgG должен быть сохранен (см. ниже).

Рассмотрим данные критерии более подробно. Результаты исследования уровней иммуноглобулинов содержат референтные интервалы, соответствующие возрасту пациента. Нижняя и верхняя границы возрастного референтного диапазона соответствуют -2 и $+2$

стандартных отклонения (SD) от среднего значения в выборке, то есть разброс внутри референтных границ составляет 4SD [16]. Таким образом, для расчета значения 2SD необходимо найти разницу между верхним и нижним референтными значениями и разделить на 2. Например, у взрослого пациента уровень IgG составляет 3,5 г/л, а биологические референтные значения для лиц старше 10 лет – 7,0–15,0 [2]. $2SD = (15 - 7)/2 = 4$. Если из нижнего референтного значения вычесть 2SD (7 – 4), то мы получим, что уровень IgG у пациента снижен, однако менее, чем на 2SD. Таким образом, данный случай не соответствует критерию ОВИН, однако в связи с постепенным характером развития заболевания необходим мониторинг уровней иммуноглобулинов не реже одного раза в 6 месяцев. Действительно, у лиц подросткового и взрослого возраста снижение уровня IgG расценивается как:

- умеренное – 3,0–6,0 г/л,
- значительное – 1,0–2,9 г/л,
- резкое – менее 1,0 г/л⁴.

В настоящее время не существует единого стандарта оценки специфического поствакцинального иммунитета. Для данных целей перспективно использование относительно безопасных вакцин, не содержащих бактериальных клеток и не имеющих ограничений к применению у взрослых, за исключением беременности: «Пневмо-23» и столбнячного анатоксина. Существуют коммерчески доступные наборы, позволяющие определять иммуноглобулины класса G, специфичные к антигенам данных вакцин методом ИФА, разрабатываются тесты для определения IgA и IgM [8]. Исследование титра антител к полисахаридным антигенам проводят до и спустя 3–4 недели после вакцинации [12]. С учетом стандартного срока ревакцинации, определяемые титры антител

должны сохраняться в сыворотке в течение пяти лет. Режим введения столбнячного анатоксина и оценки нарастания поствакцинальных титров зависит от возраста пациента и времени предыдущих ревакцинаций. Возможно использование кожной пробы Шика.

Изогемагглютинины сыворотки исследуют в иммуносерологических лабораториях с помощью реакции со стандартными эритроцитами (качественная реакция). В дальнейшем возможно проведение реакции солевой агглютинации для уточнения титра изогемагглютининов. В норме титр натуральных антител (IgM) α и β у взрослых лиц – 1:14 и 1:8 соответственно [1].

Помимо установления значительного и стойкого снижения уровня иммуноглобулинов для диагноза ОВИН критерияльным является исключение его вторичного характера. Состояния, заболевания и лекарственные средства, приводящие к вторичному снижению уровней иммуноглобулинов, представлены в таблице 1.

Гипогаμμαглобулинемии, индуцированные лекарственными средствами

Описан случай снижения уровня IgG1 при длительном пероральном применении метилпреднизолон у пациентки с бронхиальной астмой [12]. Также наблюдалось снижение числа циркулирующих В-клеток (4%), иммуноглобулина субкласса G1, отсутствие специфических пневмококковых антител после вакцинации и умеренное снижение Т-хелперов, хотя активация Т-лимфоцитов *in vitro* была сохранна. За исключением хронического синусита, у пациентки отсутствовали клинические проявления иммунодефицита, однако формально диагноз соответствовал критериям ОВИН. Авторам удалось показать нормализацию показателей иммунитета в течение двух лет в результате снижения

Таблица 1. Причины вторичной гипогаμμαглобулинемии (Conley M. E., Notarangelo L. D. и Etzioni A. [9] с изменениями)

Причины	Примеры
Заболевания и состояния	
Инфекция	ВИЧ и ВЭБ-инфекция, врожденные краснуха, токсоплазмоз, ЦМВ-инфекция
Онкология и онкогематология	Опухоли В-клеточного происхождения, тимома, солидные опухоли, в том числе раковая кахексия
Потеря белка	Нефротический синдром, ожоги, лимфостаз, тяжелая диарея
Лекарственные средства	
Антигипертензивные	Каптоприл
Противомалярийные	Хлорокин, примакин
Противоревматические	Соли золота
НПВС	Фенклофенак, сульфасалазин
Пероральные глюкокортикоиды	Метилпреднизолон [12]
Противоэпилептические	Карбамазепин, фенитоин
Хелатирующие агенты	Пеницилламин

дозы и отмены препарата. Подобное влияние могут оказывать как высокие, так и низкие дозы пероральных (но не ингаляционных) глюкокортикоидов при длительном применении.

Механизмы, лежащие в основе данного феномена, не ясны. Вероятно, некоторые лекарственные средства могут влиять на поздние этапы дифференцировки В-клеток. Высокореактивные сульфгидридные группы лекарственных средств потенциально способны формировать иммунные комплексы, провоцировать иммунную дисрегуляцию и аутоиммунные процессы. В половине случаев после отмены препарата уровни антител восстанавливаются до первоначальных значений, однако может потребоваться до нескольких лет. У одного пациента гипогаммаглобулинемия может возникать при использовании различных лекарственных средств, что свидетельствует о предрасположенности к фармакологической индукции [18].

Общая вариабельная иммунная недостаточность

Первое сообщение о пациенте, страдавшем гипогаммаглобулинемией и выраженной спленомегалией, то есть имевшем клинический фенотип ОВИН, было сделано британским врачом Olhagen в 1953 году [18]. Как самостоятельная нозологическая единица ОВИН была выделена в 1973 году для дифференциации от других врожденных иммунодефицитов, протекающих с нарушением синтеза антител. Заболевание носило также название поздней гипогаммаглобулинемии, дисгаммаглобулинемии и синдрома Giedion–Scheidigger [7]. В настоящее время в МКБ-10 данному заболеванию соответствует код D83.

ОВИН — самая частая форма ПИД; распространенность сильно варьирует: среди европейцев она составляет около 1 : 25 000 [7, 21], однако очень редко встречается среди африканцев и монголоидов. ОВИН — это диагноз исключения, когда генетическую причину гипогаммаглобулинемии установить не удастся, и, вероятно, представляет собой группу из нескольких заболеваний. Учитывая большой спектр внешних причин недостаточности уровня иммуноглобулинов, с одной стороны, и наличие тяжелых форм ПИД, требующих трансплантации костного мозга, с другой, ОВИН протекает таким образом, что далеко не сразу формируется представление о системном характере заболевания, а не о нескольких, повторяющихся эпизодах инфекции. Классификация IUIS включает нетяжелые формы ОВИН, при которых содержание сывороточных IgA и IgG может составлять 3–7 г/л [21].

Клиническая картина

ОВИН может манифестировать в любом возрасте. У большинства пациентов диагноз устанавливается во 2–3 декаде жизни, однако рецидивирующие инфекции наблюдаются с детского возраста. Существуют три пика диагностики ОВИН: 2–7, 25–30 и 50–60 лет [10].

Около трети пациентов составляют дети [21]. Попытки связать клинический фенотип и лабораторные находки оказались безуспешными, что предполагает участие в патогенезе неинфекционных осложнений неизвестных генов, отличных от этиологических генов иммунодефицита. В британском исследовании (n = 58) 50% пациентов с ОВИН имели лишь инфекционную патологию, 34% сопутствующие орган-специфические аутоиммунные заболевания, 17% — аутоиммунные цитопении, 16% — поликлональную лимфопротиферацию, 5% — энтеропатии [6].

Инфекционные проявления

Клинический спектр инфекционных проявлений ОВИН весьма широк. Наиболее часто у пациентов развиваются инфекции дыхательных путей и ЛОР-органов: рецидивирующие синуситы, тонзиллиты, отиты, бронхиты. В США пневмонию диагностируют у трети пациентов [10]. Возбудители пневмонии могут быть типичными (*Streptococcus pneumoniae*), атипичными (*Mycobacteria*) и оппортунистическими, например, *Moraxella catarrhalis*, *Pneumocystis jiroveci*, *Haemophilus influenzae* [7, 10, 18, 21]. Возможен старт ОВИН в виде пневмонии, менингита, септицемии. Инфекция, вызванная *Mycoplasma pneumoniae*, оказалась одной из наиболее частых причин пневмонии при ОВИН [18]. *Haemophilus influenzae* могут персистировать в миндалинах и аденоидных вегетациях в течение нескольких лет, даже при адекватной терапии.

Хронической микоплазменной инфекцией суставов страдают около 10% пациентов. В большинстве случаев длительно вовлечен один сустав (коленный, локтевой), однако встречается медленно текущий полиартрит, который может быть неверно расценен как ревматоидный. В связи с определяющей ролью антител при данных инфекциях течение процесса может быть затяжным и осложняться деструкцией тканей. Существуют свидетельства о том, что повышенная восприимчивость к микоплазменной инфекции связана с низким уровнем манноз-связывающего лектина (MBL) [10, 21]. У пациентов с ОВИН из синовиальной жидкости была также выделена *Ureaplasma urealyticum* [18].

Около 20% пациентов страдают хронической диареей, не связанной ни с какими из типичных этиологических агентов [21]. У некоторых пациентов удается выявить *Helicobacter pylori* [7], *Salmonella*, *Shigella* и *Campylobacter*. У 19% пациентов с диспепсией в биоптатах толстого кишечника обнаруживают гранулемы; у половины — изменения, характерные для целиакии [10]. Попытки доказать инфекционную этиологию воспалительной болезни кишечника остаются безуспешными, однако у мышей, нокаутных по генам ИЛ-2 и ИЛ-6, в стерильных условиях заболевание не развивается [18]. В биоптатах толстого кишечника выявляют увеличение содержания интраэпителиальных лимфоцитов, у некоторых развивается тяжелая энтеропатия с дегидратацией и потерей электролитов. Воспалительный процесс

может затрагивать исключительно тонкий кишечник, что приводит к мальабсорбции жиров и витаминов [21].

Пациенты с недостатком иммуноглобулинов чаще всего имеют нормальный иммунитет к вирусным инфекциям, таким как корь, паротит и ветряная оспа. Исключение составляют энтеровирусы: описаны случаи энтеровирусных менингоэнцефалитов, миокардитов (вирус Коксаки) и дерматомиозитов [21]. Для пациентов с ОВИН с отягощенным семейным анамнезом характерна повышенная восприимчивость к вирусным и оппортунистическим инфекциям, что предполагает комбинированный характер иммунодефицита [6].

Осложнения инфекционных процессов и другие (неинфекционные) проявления

У 30–50% пациентов с ОВИН развивается бронхоэктатическая болезнь легких, вне зависимости от наличия заместительной терапии, что, вероятно, связано с плохим проникновением в легкие препаратов иммуноглобулинов при заместительной терапии [21]. 20–25% имеют хроническое воспаление различных органов, прежде всего легких, печени и селезенки, часто с гранулематозными изменениями [6]. Механизм возникновения гранулематоза неизвестен, однако была показана связь его развития с инфекцией вирусом герпеса 8-го типа и неблагоприятным прогнозом [7, 22].

Аутоиммунные заболевания

Негативная селекция и контроль аутореактивных клонов, как и сигналы на выживание и пролиферацию, осуществляются через В-клеточный рецептор. В случае нарушения его формирования возможно образование В-клеток с одновременно высоким аутореактивным и низким пролиферативным потенциалом. Таким образом, при ОВИН В-клеточная недостаточность и аутоиммунитет не только не исключают, но и сопутствуют друг другу. Аутоиммунные заболевания или их комбинации развиваются у 20–50% пациентов [7, 10, 18, 21]. Прежде всего (20% пациентов) это цитопении: гемолитические анемии, тромбоцитопении, нейтропении [21]. Аутоиммунные проявления также включают СКВ, РА, синдром Шегрена, дерматомиозит, целиакию, инсулин-независимый СД, тиреоидит. Кроме того, возможно развитие гепатита, билиарного цирроза, синдрома Гийена–Барре, пародонтита, пернициозной анемии и другой патологии. В целом данные осложнения развиваются чаще, чем при СДIgA.

Лимфопролиферативный синдром

У половины пациентов наблюдаются лимфоаденопатия и спленомегалия [2]. Гиперспленизм может быть самостоятельной причиной нейтропении и тромбоцитопении; иногда показана спленэктомия [21]. Возможна инфильтрация поликлональными лимфоцитами внутренних органов, например, печени и почек, что может приводить к развитию их недостаточности [7]. Лимфо-

пролиферация носит доброкачественный характер и, вероятно, также связана с герпетической инфекцией [10].

Онкологические заболевания

Ретроспективные исследования с 1970-х гг. выявили увеличение частоты рака желудка и лимфом у взрослых пациентов с ОВИН [7]. Оценки риска развития онкологических заболеваний сильно варьируют в разных исследованиях. В последнее время лимфомы стали доминирующей причиной смерти пациентов [21]. Наиболее типично развитие экстранодулярных В-клеточных лимфом маргинальной зоны. В отличие от лимфом при других ПИД, опухолевые клетки обычно дифференцированы, секреторируют иммуноглобулины и ВЭБ-негативны [7]. Высокий риск развития рака желудка, по-видимому, объясняется персистенцией *Helicobacter pylori*.

Диагностика

Диагностику ОВИН необходимо начинать с тщательного анализа истории болезни пациента и его медикаментозной терапии и исключения вторичных причин гипогаммаглобулинемии. Следующим шагом диагностики является оценка специфического иммунного ответа по отношению к Т-независимым полисахаридным антигенам и Т-зависимым белковым антигенам, исследование гемагглютининов.

Дифференциальную диагностику проводят с X-сцепленной агаммаглобулинемией (мутации протеинкиназы Брутона), гипер-IgM-синдромом, хронической гранулематозной болезнью, селективными дефицитами иммуноглобулинов и компонентов комплемента [7, 11].

Диагностические подходы к выявлению ОВИН методом проточной цитометрии: циркулирующие В-клетки

В настоящее время наиболее достоверным способом подтверждения диагноза является обнаружение нарушения поздних этапов дифференцировки В-клеток. Первая лабораторная классификация ОВИН, основанная на функциональном тестировании В-клеток, была создана в 1980-х гг. Вруант и соавт., однако не получила широкого распространения в диагностике в связи с отсутствием воспроизводимости методики. Впоследствии идею исследования В-клеток для диагностики и классификации случаев ОВИН использовали две другие группы во Фрайбурге [13] (Германия) и Париже [19]. В 2008 году их усилия были объединены в общую проточно-цитометрическую классификацию под названием EUROClass, которая обеспечивает также прогноз осложнений ОВИН [22]. В исследовании участвовали более 300 пациентов старше 10 лет.

Целью создания классификации являлась идентификация маркеров-имитаторов клинических проявлений ОВИН: спленомегалии, лимфоаденопатии, гранулематозной болезни и аутоиммунных состояний

(табл. 2). Классификация предполагает оценку нескольких субпопуляций циркулирующих В-клеток: зрелых В-клеток памяти, транзиторных и CD21^{low} В-клеток [22].

Более чем у 75% пациентов с ОВИН выявлялось снижение числа В-клеток памяти, что подразумевает дисфункцию герминальных центров, критичных для Т-зависимого иммунного ответа, и клинически сопровождается увеличением частоты развития гранулематозной болезни и спленомегалии [15]. Снижение количества В-клеток памяти не является патогномоничным для ОВИН и характерно для синдрома гипериммуноглобулинемии М, синдрома Вискотта–Олдрича, Х-сцепленного лимфопролиферативного синдрома и идиопатической CD4-лимфопении [22]. Экспансия транзиторных В-клеток ассоциирована с лимфоаденопатией и также наблюдается при Х-сцепленном лимфопролиферативном синдроме и идиопатической CD4-лимфопении. Увеличение числа CD21^{low} (более 10% среди всех В-клеток) является маркером спленомегалии; характерны более поздняя манифестация ОВИН и существенная задержка установления диагноза [22].

Исследования Т-лимфоцитов и других циркулирующих клеток

У некоторых пациентов наблюдается умеренная CD4 Т-клеточная лимфопения. У 30% пациентов она сопровождается относительным CD8⁺ Т-лимфоцитозом часто за счет перфорин-содержащих активированных клеток, которые могут быть ответственны за нейтропению и воспалительную болезнь кишечника [7, 21]. Возможно также нарушение Т- и В-клеточного взаимодействия, пролиферации и синтеза цитокинов Т-клетками, экспрессии CD40-лиганда; в настоящее время неизвестно, связаны ли они с хроническими инфекциями или первичны [7, 15, 21].

В недавнем исследовании в Великобритании [6] с определением абсолютных значений Т-клеточных субпопуляций у пациентов с хорошо документированными проявлениями ОВИН были выявлены следующие отклонения в Т-клеточном звене иммунитета:

- Снижение иммунорегуляторного индекса, за счет уменьшения как общего числа CD4⁺ Т-клеток, так и увеличения количеств CD8⁺.
- Снижение экспрессии молекул CD27 и CD28 как CD4, так и CD8⁺ Т-лимфоцитах, что свидетельствует об их активации и дифференцированности. Вероятно, это следствие увеличения количества специфических Т-лимфоцитов (ЦМВ, ВЭБ) [15, 21].
- Снижение числа фолликулярных Т-клеток при наличии хронической гранулематозной болезни.
- Снижение количества Т-регуляторных клеток (Трег) при лимфопролиферации, аутоиммунной цитопении и других аутоиммунных заболеваниях. Данный феномен может быть следствием секвестрации Трег в сайтах хронического воспаления, однако неизвестно, насколько они представлены в гранулемах [15].

У пациентов из группы с изолированными инфекционными проявлениями не было выявлено существенных отклонений Т-клеточного звена, что предполагает связь аномалий Т-лимфоцитов с развитием осложнений ОВИН в большей степени, чем с патогенезом дефицита иммуноглобулинов.

Дефекты врожденного иммунитета при ОВИН затрагивают TLR9, продукцию ИЛ-12 и ИЛ-17 и MBL [7].

Генетика

ОВИН, по определению, представляет собой группу гипогаммаглобулинемий с неустановленной молекулярной причиной. В связи с этим выявление нового значи-

Таблица 2. Классификационно-прогностическая схема EUROClass²²

Тип В-: <1% циркулирующих В-клеток			
Тип В+: >1% циркулирующих В-клеток:			
	1. Подтип CD21 ^{low} : >10% CD21 ^{low} В-клеток:		ассоциирован со СМ
	a. smB ⁺ : >2% CD27 ⁺ /IgD ⁻ /IgM ⁻ рекомбинантных В-клеток памяти	b. smB ⁻ : ≤2% CD27 ⁺ /IgD ⁻ /IgM ⁻ рекомбинантных В-клеток памяти	ассоциирован со СМ и ГБ
			I. TrHi: ≥9% CD38 ^{hi} /IgM ^{hi} транзиторных В-клеток
	II. TrNorm: <9% CD38 ^{hi} /IgM ^{hi} транзиторных В-клеток		
	2. Подтип CD21 ^{low} в норме: ≤10% CD21 ^{lo} В-клеток		
	a. smB ⁺ : >2% CD27 ⁺ /IgD ⁻ /IgM ⁻ рекомбинантных В-клеток памяти	b. smB ⁻ : ≤2% CD27 ⁺ /IgD ⁻ /IgM ⁻ рекомбинантных В-клеток памяти	самый низкий риск ГБ
			ассоциирован со СМ и ГБ
	I. TrHi: ≥9% CD38 ^{hi} /IgM ^{hi} транзиторных В-клеток		ассоциирован с ЛА
II. TrNorm: <9% CD38 ^{hi} /IgM ^{hi} транзиторных В-клеток			

СМ — спленомегалия, ЛА — лимфоаденопатия, ГБ — гранулематозная болезнь.

мого генетического дефекта приводит к выделению его в отдельную нозологическую форму, относящуюся к той же группе ПИД — «преимущественные дефициты антител с существенным снижением уровней иммуноглобулинов как минимум двух классов и нормальным или низкими количествами В-клеток». В связи с трудностями организации генетического тестирования, в практическом смысле их по-прежнему можно рассматривать в совокупности. Несмотря на все усилия, исследователям лишь отчасти удалось провести параллели между генетическими дефектами, этапами дифференцировки В-клеток и их иммунофенотипом. Ниже представлены сведения о генетических дефектах, выявленных на сегодня в группе ОВИН, за исключением дефектов CD20 и CD81, сведений о которых в данный момент недостаточно. В литературе описано не более десяти не связанных друг с другом случаев выявления данных дефектов [5].

Ген CD19

Все известные сегодня мутации CD19 приводят к потере С-терминального сигнального домена и снижению или отсутствию экспрессии CD19 на В-клетках [10]. Экспрессия CD20 (второго линейного маркера В-клеток) при этом сохранна. Отсутствие CD19 увеличивает порог чувствительности В-клеточного рецептора, что приводит к нарушению ответа на ревакцинацию, снижению В-клеточной пролиферативной способности *in vitro* и числа В-клеток памяти. Отмечают также снижение числа CD5+ В-клеток (В1) [7]. Гетерозиготные носители мутации не имеют клинических проявлений, однако уровень экспрессии CD19 у них снижен. Во всех описанных случаях заболевание манифестировало у детей, в первую очередь, гастроинтестинальными проявлениями и рецидивирующими инфекциями [10].

Ген ICOS

Рецептор Т-лимфоцитов индуцибельный костимулятор необходим В-клеткам на стадии дифференцировки в плазматические клетки и В-клетки памяти, а также для пролиферации и переключения классов иммуноглобулинов. В 1% случаев ОВИН удалось выявить универсальный дефект данного гена, который приводит к отсутствию его экспрессии на Т-клетках. Для данного дефекта характерны манифестация заболевания во взрослом возрасте, снижение числа В-клеток памяти и IgM-В-клеток памяти, лимфоидная гиперплазия и спленомегалия [10, 18].

Ген TAC1

Увеличение экспрессии данного рецептора на В-клетках маргинальной зоны и транзиторных В-клетках индуцируется сигналингом с CD40 и поверхностного IgM. Роль TAC1 для развития В-клеток двойственна: с одной стороны, рецептор необходим для переключения классов на IgA, а с другой — участвует в негативной регуляции

В-клеток. Транзиторные В-клетки при этом обычно сохранны, однако может снижаться количество В-клеток памяти. Наиболее постоянными лабораторными симптомами были нарушение ответа на полисахаридные антигены и сохранность уровня IgM [7]. Большинство случаев ОВИН с дефектом TAC1 диагностировали у пациентов 30–70 лет. Практически все пациенты с дефектом TAC1 страдают рецидивирующими инфекциями со смещением в сторону инкапсулированных бактерий, у трети развивается лимфопролиферативный синдром, у четверти — аутоиммунные состояния [10]. Клиническая картина может соответствовать как ОВИН, так и СДІgА. У 30% наблюдались «мягкие» формы аутоиммунных состояний и лимфопролиферативный синдром ограничивался спленомегалией и тонзиллярной гиперплазией [7].

Ген BAFF-R

Данная поверхностная молекула В-клеток, как и TAC1, относится к семейству рецепторов фактора некроза опухоли (ФНО). Известно, что BAFF-R необходим для выживания В-клеток. Показана корреляция BAFF-R со снижением числа циркулирующих CD21+ и CD38+ В-клеток [21]. Мутации были выявлены также при СКВ и ревматоидном артрите [12]. Сведения о клиническом фенотипе дефекта рецептора ограничиваются предрасположенностью к инфекциям, в том числе грибковым [18].

Перечисленные дефекты объясняют не более 25% случаев ОВИН, другие механизмы развития заболевания остаются неизвестными [7]. У большинства пациентов ОВИН и СДІgА возникают спорадически. Отягощенность семейного анамнеза удается выявить не более чем у 20%, причем типична ситуация, когда в поколении родителей диагностируют ОВИН, а у детей СДІgА [18, 21]. Вероятно, ОВИН и СДІgА являются проявлениями одного и того же заболевания. В таком случае, они должны быть обусловлены аллельными вариантами и вариативной экспрессией одних и тех же генов. Для обоих заболеваний показана связь с вариантами HLA II (DR и DQ) и III (локусы генов C2, C4A, C4B и CYP21) классов, однако конкретные гаплотипы предрасположенности не установлены [7, 18].

Селективный дефицит IgA

История селективного дефицита иммуноглобулина А (СДІgА) началась в 1964 году, когда у двух клинически здоровых врачей-лаборантов было случайно выявлено отсутствие IgA [18]. Впоследствии было показано, что данный дефект часто сопровождается повышенной восприимчивостью к инфекциям. Распространенность СДІgА — наиболее высокая среди ПИД, составляет 1:700–1:600 здоровых лиц и сильно варьирует в зависимости от этнической принадлежности, но в среднем, выше среди представителей европеоидной расы и ниже в азиатской популяции [17, 23]. Заболевание мо-

жет манифестировать в любом возрасте и протекать бессимптомно. Относительная мягкость клинических проявлений затрудняет исследования в области СДІgА и требует использования метода случай-контроль.

Сывороточный (мономерный) ІgА не способен активировать каскад комплемента и активирует фагоциты через Fc рецепторы, что обеспечивает выведение иммунных комплексов из кровотока без развития воспаления. Кроме того, ІgА ингибирует хемотаксис нейтрофилов, связывая их хемоаттрактанты [23]. Нормальная микробиота интестинального тракта, дыхательных и мочеполовых путей окружена секреторным ІgА, который препятствует адгезии и пенетрации бактерий. Синтез ІgА может быть как Т-зависимым, так и Т-независимым и происходит, в первую очередь, в лимфоидных тканях, ассоциированных с тканями кишечника (GALT). Несмотря на критичность роли секреторного ІgА, некоторые пациенты с СДІgА не имеют никаких симптомов. Возможно, часть функций ІgА компенсируется увеличением концентрации ІgМ, эволюционно, структурно и функционально близкого класса иммуноглобулинов.

В основе заболевания лежит дефект созревания ІgА-продуцирующих В-лимфоцитов. В-клетки экспрессируют ІgА, однако они имеют фенотип незрелых клеток и коэкспрессируют ІgМ и ІgD и не способны формировать ІgА-секретирующие плазматические клетки. При СДІgА были описаны дефекты В-клеток, дисфункции Т-хелперов и Т-регуляторов [23], однако отклонений в Т-клеточных субпопуляциях пациентов с СДІgА обнаружено не было [6]. Возможно, патогенетически значимы нарушения в системе цитокинов (ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-7, ІЛ-10, TGFβ и ІЛ-21) [23]. Генетические дефекты и тип наследования при СДІgА четко не установлены. Безусловно, существует патогенетическая связь СДІgА и ОВИН, затрагивающая систему TNF и их рецепторов-участников переключения классов иммуноглобулинов (TACI, BAFF и APRIL). Кроме того, была выявлена ассоциация с определенными гаплотипами MHC классов II (DR и DQ) и III (C2, C4A, C4 B и CYP21) [7, 18].

Клиническая картина

65–70% лиц с дефицитом ІgА не имеют клинической симптоматики [17]. В манифестных формах клиническая картина заболевания включает рецидивирующие инфекции дыхательных путей (прежде всего верхних), аллергические и аутоиммунные проявления. Среди возбудителей инфекции дыхательных путей преобладают *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*. Возможно развитие вторичной бронхоэктатической болезни. Гастроинтестинальные проявления включают лямблиоз, мальабсорбцию, непереносимость глюкозы, целиакию, язвенный колит и нодулярную лимфоидную гиперплазию [23]. В ходе исследования, проведенного в Исландии, ни у одного пациента с СДІgА (n = 32) не было выявлено целиакии; инфекции гастроинтестинального и урогенитального тракта встречались не чаще,

чем в группе сопоставления. У четверти пациентов были выявлены аутоиммунные заболевания: РА, саркоидоз, пернициозная анемия, псориаз, тиреоидит, тромбоцитопеническая пурпура. Достоверно чаще встречались грибковые заболевания кожи и ногтей [17].

Аллергические проявления — бронхиальная астма, atopический дерматит, аллергический ринит, конъюнктивит, пищевая аллергия — были зафиксированы у 84% пациентов с СДІgА. Около 25% случаев СДІgА диагностируются в ходе иммунологического обследования на предмет аутоиммунной патологии и аллергологического обследования [17, 23].

Аутоиммунные состояния — одно из наиболее частых клинических проявлений СДІgА [18, 23]. Вероятно, данный феномен с повышенной проницаемостью слизистой респираторного и желудочно-кишечного тракта и перекрестным реагированием. У пациентов выявляются антитела против ганглиозидов, кардиолипина, фосфатидилсерина и коллагена, антинуклеарные антитела. Наиболее распространенным состоянием является идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, затем следуют гемолитическая анемия, ревматоидный артрит, тиреоидит, системная красная волчанка и асимптоматическое присутствие различных аутоантител.

По результатам длительных наблюдений у пациентов с СДІgА не было выявлено увеличение риска развития онкогематологических заболеваний, язвенной болезни и рака желудка. Более того, ни у клинически здоровых лиц, ни у пациентов с ІgА-дефицитом не было показано увеличение титра специфических ІgG против *Helicobacter pylori*, что свидетельствует против предположения о ключевой роли ІgА в иммунитете к данному микроорганизму [18]. По другим данным, у нескольких пациентов старшего возраста развивались гастроинтестинальные и лимфоцитарные онкологические заболевания [23].

Диагностика

Показанием для обследования на предмет СДІgА являются рецидивирующие гастроинтестинальные инфекции и инфекции дыхательных путей, в сочетании с аллергическими и аутоиммунными состояниями. Диагностика осложняется тем, что для большинства лабораторий диагностический порог СДІgА (0,07 г/л) является также и порогом детекции аналита. Более распространенное состояние, когда концентрация ІgА выше 0,07 г/л, но ниже двух стандартных отклонений от среднего возрастного значения, называется парциальной недостаточностью ІgА [23]. Данное состояние часто сопровождается снижением содержания секреторного ІgА, однако четкая корреляция не установлена. У трети пациентов обнаруживают повышенные уровни субклассов ІgG 1 и 3. В качестве дополнительного критерия можно использовать отсутствие субклассов ІgG 2 и 4 [18]. Повреждения TACI расцениваются как факторы тяжести течения ОВИН и СДІgА. Кроме того, с пред-

расположенностью к СДІgА были ассоциированы определенные гаплотипы МНС.

Дефицит ІgА обратимого характера может развиваться вследствие применения некоторых лекарственных средств (каптоприл, вальпроевая кислота, D-пеницилламин, карбамазепин, ибупрофен) и действия инфекционных агентов: вируса краснухи, ЦМВ, токсоплазмы, что требует исключения данных причин.

Анти-ІgА антитела

У 60% пациентов с ОВИН и тотальным СДІgА определяются анти-ІgА антитела класса G (G1 и G4). Также описано присутствие антител классов M и E. Причины их появления не установлены, однако оно может быть связано с трансплацентарным проникновением материнских ІgА в ткани плода, НLA-фенотипом или аллотипом гамма-цепи ІgG. Было зафиксировано несколько случаев анафилактических реакций при введении препаратов иммуноглобулинов, эритроцитов, тромбоцитов, содержащих следовые количества ІgА. Перед гемотрансфузией пациентам с ІgА недостаточностью показано определение специфических иммуноглобулинов класса E против ІgА. Доступность такого исследования весьма ограничена, но, к счастью, в качестве скринингового теста можно исследовать ІgG к ІgА [23].

Заключение

Алгоритм действий врача-клинициста при подозрении на наличие ОВИН включает шаги, перечисленные ниже.

1. Работа с анамнестическими данными. Необходимо исключить заболевания и состояния, приводящих к вторичной гипогаммаглобулинемии, детальный анализ используемой медикаментозной терапии, тщательный сбор семейного анамнеза.

2. Осмотр. Особого внимания требует осмотр лимфоидной ткани: лимфоузлов, миндалин, селезенки и состояния их состояния состоянию пациента, а также осмотр печени, суставов, кожи и ногтей, пародонта.

3. Лабораторное и инструментальное обследование. Ключевым лабораторным тестом является исследование уровня иммуноглобулинов. Дальнейшее обследование включает оценку поствакцинального иммунитета и/или изогемагглютининов, субпопуляционного состава лимфоцитов, циркулирующих В-клеток. Минимальное инструментальное обследование: рентгенография органов грудной полости, УЗИ органов брюшной полости, ФВД.

5. Консультации иммунолога. Иммунолог организует верификацию диагноза и дифференциацию с другими формами ПИД, назначает дополнительное обследование (в том числе генетическое тестирование), дает заключение для оформления инвалидности.

6. Регистрация случая ПИД. К сожалению, ни одно из заболеваний группы ПИД не вошло в перечень орфанных заболеваний, утвержденный постановлением

Правительства РФ в апреле 2012 года. В связи с этим сегодня регистрировать случаи ПИД необходимо в Регистре РДКБ (Москва) [3], созданном при участии ESID, а также в Диагностическом медико-генетическом центре (Санкт-Петербург, ул. Тобольская, д. 5) и Национальной ассоциации организаций больных редкими заболеваниями «Генетика».

7. Оформление инвалидности. Обеспечение пациентов с ОВИН дорогостоящими препаратами заместительной терапии может осуществляться в рамках Индивидуального пакета реабилитации инвалида. Для направления пациента на Медико-социальную экспертизу и разработки реабилитационного пакета решающее значение имеет заключение иммунолога.

Проблема диагностики и лечения ПИД, как и других орфанных заболеваний, в России имеет выраженный социальный характер и осложняется недостаточным уровнем осведомленности и настороженности медицинской общественности. Каждый случай ПИД требует персонализированного подхода и совместной работы нескольких специалистов. Такой кооперации во многом способствуют деятельность рабочих групп (в том числе в Санкт-Петербурге) и общественных организаций, проведение конференций (например, в рамках проекта EUROPLAN, празднования Дня редких заболеваний). Актуальные сведения о ПИД доступны на информационных порталах в России и Европе:

<http://www.rarediseases.ru/> — информационный портал по редким заболеваниям, «лекарствам-сиротам» и редко применяемым медицинским технологиям (Санкт-Петербург);

<http://www.nacgenetic.ru/> — Национальная ассоциация организаций больных редкими заболеваниями «Генетика» (Санкт-Петербург);

<http://www.rare-diseases.ru/> — Всероссийский Союз обществ пациентов (Москва);

<http://www.fondpodsolnuh.ru/> — Фонд помощи детям с нарушениями иммунитета «Подсолнух»;

<http://www.esid.org/> — Европейское сообщество по проблемам иммунодефицитов;

<http://www.iuisonline.org/iuis/index.php> — Международный Союз иммунологических обществ.

Литература

1. Башлай А. Г., Донсков С. И. и авторы-разработчики. Иммуносерология. Нормативные документы. М.: Гематологический центр РАМН, 1998: 152.

2. Зуева Е. Е., Куртова А. В., Рыжак А. П., Горчакова М. В., Галкина О. В., Чередниченко Д. В. Иммунная система. Иммунограмма. Рекомендации по назначению и применению в лечебно-диагностическом процессе. СПб. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008: 60.

3. Кондратенко И. В., Сидоренко И. В., Караулов А. В. и соавт. Регистр первичных иммунодефицитов // Медицинская иммунология. 2002; 4 (2): 220.

4. Agarwal S., Cunningham-Rundles C. Assessment and clinical interpretation of reduced IgG values // Ann. Allergy Asthma Immunol. 2007; 99 (3): 281–283.

5. *Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J. L. et al.* Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency // *Front Immunol.* 2011; 2: article 54.
6. *Bateman E. A. L., Ayers L., Sadler R. et al.* T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections // *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 170 (2): 202–11.
7. *Blanco-Quirósa A., Solís-Sánchez P., Garrote-Adrados J. A., Arranz-Sanz E.* Common variable immunodeficiency. Old questions are getting clearer // *Allergol. Immunopathol. (Madr).* 2006; 34 (6): 263–275.
8. *Cavaliere F. M., Milito C., Martini H., Schlesier M. et al.* Quantification of IgM and IgA Anti-Pneumococcal Capsular Polysaccharides by a New ELISA Assay: a Valuable Diagnostic and Prognostic Tool for Common Variable Immunodeficiency // *J. Clin. Immunol.* 2012; Dec 29. [Epub ahead of print].
9. *Conley M. E., Notarangelo L. D., Etzioni A.* Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). Diagnostic Criteria for Primary Immunodeficiencies // *Clin. Immunol.* 1999; 93 (3): 190–197.
10. *Deane S., Selmi C., Naguwa S. M., Teuber S. S., Gershwin M. E.* Common Variable Immunodeficiency: Etiological and Treatment Issues // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2009; 150 (4): 311–324.
11. *de Vries E.* European Society for Immunodeficiencies (ESID) members. Patient-centred screening for primary immunodeficiency, a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists: 2011 update // *Clin. Exp. Immunol.* 2012; 167 (1): 108–119.
12. *Fedor M. E., Rubinstein A.* Effects of long-term low-dose corticosteroid therapy on humoral immunity // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2006; 97 (1): 113–116.
13. *Ferry B. L., Jones J., Bateman E. A., Woodham N. et al.* Measurement of peripheral B cell subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID) using a whole blood method // *Clin. Exp. Immunol.* 2005; 140 (3): 532–539.
14. *Gathmann B., Binder N., Ehl S., Kindle G.* ESID Registry Working Party. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: update 2011 // *Clin. Exp. Immunol.* 2012 Mar; 167 (3): 479–491.
15. *Horn J., Manguiat A., Berglund L. J., Knerr V., Tahami F., Grimbacher B., Fulcher D. A.* Decrease in phenotypic regulatory T cells in subsets of patients with common variable immunodeficiency // *Clin. Exp. Immunol.* 2009; 156 (3): 446–454.
16. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline — Second Edition. NCCLS document C28-A2. 2000; 20 (13): 13.
17. *Jorgensen G. H., Gardulf A., Sigurdsson M. I., Sigurdardottir S. Th., Thorsteinsdottir I., Gudmundsson S., Hammarström L., Ludviksson B. R.* Clinical Symptoms in Adults with Selective IgA Deficiency: A Case-Control Study // *J. Clin. Immunol.* 2013; Feb 7. [Epub ahead of print].
18. *Ochs H. D., Edvard Smith C. I., Puck J. M., editors.* Primary Immunodeficiency Diseases — A Molecular and Genetic Approach. Oxford University Press, Inc. 2007: 313–325.
19. *Piqueras B., Lavenu-Bombled C., L. Galicier C., Bergeron-van der Cruyssen F., Mouthon L., Chevret S., Debré P., Schmitt C., Oksenhendler E.* Common Variable Immunodeficiency Patient Classification Based on Impaired B Cell Memory Differentiation Correlates with Clinical Aspects *J. Clin. Immunol.* 2003; 23 (5): 385–400.
20. The Jeffrey Modell Foundation. 10 warning signs of primary immunodeficiency. <http://www.info4pi.org/aboutPI/index.cfm?section=aboutPI&content=warningsigns> (Accessed February 2013).
21. *Webster A. D. B.* Clinical and Immunological Spectrum of Common Variable Immunodeficiency (CVID) // *Iran. J. Allergy Asthma Immunol.* 2004 Sep; 3 (3): 103–113.
22. *Wehr C., Kivioja T., Schmitt C., Ferry B. et al.* The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency // *Blood.* 2008 Jan 1; 111 (1): 77–85.
23. *Yel L.* Selective IgA Deficiency // *J. Clin. Immunol.* 2010 Jan; 30 (1): 10–16.

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ

Т. Г. СКОРОХОДОВА¹, С. В. МАТУШКИНА¹, Д. А. ГРИШЕНКО²

¹ Централизованная клиничко-диагностическая лаборатория, центр «Охраны материнства и детства», г. Красноярск

² ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Минздрава России, г. Красноярск

Резюме. Авторы статьи делятся собственным опытом получения качественных образцов капиллярной крови. Показаны преимущества использования контактно-активируемых ланцетов и микропробирок с K2ЭДТА для проведения гематологических исследований капиллярной крови.

Ключевые слова: преаналитическая фаза, капиллярная кровь, гематология, ланцет, пробирки.

MODERN TECHNOLOGIES FOR PRECISE ANALYSIS OF CAPILLARY BLOOD

T. G. SKOROKHODOVA¹, S. V. MATUSHKINA¹, D. A. GRISHENKO²

¹ Centralized clinical diagnostic laboratory, center of mother and child care, Krasnoyarsk

² "Federal center of cardiovascular surgery" Ministry of Health Care of Russia, Krasnoyarsk

Summary. The authors share their own experiences of obtaining capillary blood samples for precise analysis. The advantages of contact-activated lancets and microtubes with K2EDTA have been demonstrated for hematological analysis of capillary blood.

Key words: preanalytical phase, capillary blood, hematology, lancet, containers.

Данные для корреспонденции:

Грищенко Джон А., заведующий клинико-диагностической лабораторией ФГБУ

«Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Минздрава России (г. Красноярск),

Президент Красноярской краевой ассоциации специалистов медицинской лабораторной диагностики.

660022, г. Красноярск, ул. Караульная, д. 45

тел./факс: (391)226-8230, моб: +7-902-942-7687

В клинической практике довольно часто возникают ситуации, когда невозможно взять кровь для лабораторных исследований из периферических вен. Это, прежде всего, недоношенные дети и дети первого года жизни, пожилые люди и тучные пациенты, находящиеся в критическом состоянии. Для этого существуют системы, предназначенные для взятия, транспортировки и последующего исследования капиллярной крови. Наибольший спектр микропробирок (микротейнеров со встроенным коллектором) для взятия капиллярной крови с тем же спектром реагентов, что и для пробирок, предназначенных для взятия венозной крови (за исключением пробирок для исследования гемостаза), производится компанией «Бектон Дикинсон». Как известно, лабораторное исследование делится на три основных этапа: преаналитический (внелабораторный), аналитический и постаналитический. Аналитический этап непосредственно связан с функцией лаборатории, и он легко контролируется специалистами лабораторий, а использование современных систем для диагностики (ав-

томатические анализаторы, диагностические наборы, контрольные материалы и калибраторы) сводят к минимуму ошибки на лабораторном этапе. Преаналитический этап в наименьшей степени может контролироваться лабораторией, т. к. значительная часть этого этапа осуществляется сотрудниками лечебных учреждений. И именно с этим этапом связано до 93% ошибок при производстве анализов [5].

Централизованная клиничко-диагностическая лаборатория центра «Охраны материнства и детства» выполняет исследования для 40 лечебных учреждений города Красноярска. Поэтому очень остро стоит вопрос правильной подготовки пациентов и взятия биологического материала у детей. Контроль преаналитических факторов является ключевым для обеспечения качественных результатов. За счет снижения числа ошибок на любом этапе преаналитической подготовки можно существенно улучшить качество исследований, снизить количество повторных проб, сократить расходы рабочего времени и средств на обследование пациентов. Немаловажным

является психологический и физический дискомфорт пациента, когда встает вопрос о повторном получении биоматериала (дети и беременные женщины).

В ЦКДЛ выполняются исследования для детей амбулаторно-поликлинической службы города, что составляет 43% от всех выполняемых исследований. И 57% выполняется для пациенток женских консультаций города.

Проведенный анализ отбракованных гематологических проб за год позволил оценить частоту возникновения ошибок на преаналитическом этапе. Исследования гемограмм в среднем в месяц составляют 17 500. Для выполнения гематологических исследований мы используем капиллярную и венозную кровь. Гематологические исследования из капиллярной крови мы проводим только у детей, и эта доля составляет 58%, а 42% составляет исследование венозной крови (это дети старшего возраста и женское население). Процент брака при получении капиллярной крови составил 2,2%, при венопункции процент составил 0,7%. Таким образом, процент ошибок при взятии капиллярной крови в три раза выше, чем при взятии венозной. Основные причины низкого качества взятых проб крови: сгустки в пробе и нарушение объема пробы, которое приводит к нарушению соотношения кровь-антикоагулянт (рис. 1).

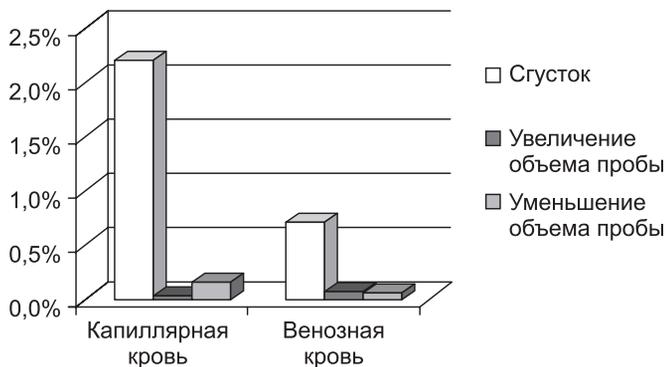


Рис. 1. Основные причины низкого качества взятых проб крови

Пробы, полученные со сгустками, составили наибольшую долю ошибок как при получении капиллярной, так и при получении венозной крови. Сгустков в капиллярной крови было получено в три раза больше, чем в венозной. Чем можно объяснить данный факт?

- Контактной активацией свертывания при взятии капиллярной крови;
- Выходом тканевого тромбопластина при давлении пальца;
- Относительно длительной по времени процедурой взятия крови;
- Небольшим объемом пробы и в связи с этим проблематичностью перемешивания;
- Недостаточным и несвоевременным перемешиванием пробирки.

Венозная кровь считается лучшим материалом для лабораторных исследований. При известной стандарти-

зации процессов взятия, хранения, транспортировки венозной крови удается добиться минимальной травматизации и активации клеток, примеси тканевой жидкости, при этом всегда имеется возможность повторить и/или расширить анализ (например: при низком гемоглобине назначить ретикулоциты) и, как следствие, минимизировать необходимость повторных процедур взятия крови (очень важный фактор для детей) и влияние на правильность и точность результатов.

Взятие капиллярной крови для лабораторных исследований возможно в следующих ситуациях:

- при ожогах, занимающих большую площадь поверхности тела пациента;
- при выраженном ожирении пациента;
- при установленной склонности к венозному тромбозу;
- у новорожденных;
- при настойчивом желании родителей.

Анатомическое строение кровеносной системы детей обуславливает необходимость правильно сделать выбор места пункции и медицинского инструментария. В педиатрической практике возможно взятие капиллярной крови из пальца, пятки и в редких случаях из мочки уха. Пункция пальца не должна производиться у младенцев, так как это может привести к повреждению костной ткани. В таком случае подходящим местом прокола для получения образца является пятка у дистальной части пяточной кости. В связи с этим представляется важным использование автоматических ланцетов, гарантирующих низкую травматичность и соблюдение нужной глубины прокола, в зависимости от типа выбранного ланцета. Между объемом получаемой крови и глубиной прокола существует прямая зависимость. В связи с этим тип ланцета должен подбираться в соответствии с местом прокола и объемом получаемого образца. Компания «Бектон Дикинсон» производит одноразовые ланцеты с разным типом прокалывающего устройства: игла или лезвие, а также с разной глубиной прокола. Контактно-активируемые ланцеты BD Microtainer® с корпусом фиолетового цвета предназначены для получения одной капли крови и гарантируют отсутствие болевого синдрома у пациентов не менее, чем в 90% случаев [2], тогда как ланцеты BD Microtainer® с корпусом голубого цвета предназначены для получения до 0,5 мл крови и обеспечивают скорость капиллярного кровотока не менее 2 мкл/с [1]. Для взятия капиллярной крови у новорожденных предпочтение должно отдаваться контактно-активируемым BD Quikheel™ с лезвием, осуществляющим полукруговое режущее движение, что позволяет получить хороший ток крови из ранки не менее, чем в 90% случаев [7].

Учитывая возрастные особенности поведения детей во время процедуры взятия крови (подвижность, эмоциональный стресс и т.д.), следует обратить внимание на последовательность заполнения пробирок. Для корректного забора капиллярной крови начать следует

с пробирок с антикоагулянтами (на гематологические исследования), а затем использовать микротейнеры или пробирки для получения сыворотки или плазмы, предназначенной для биохимических, иммунологических и других видов исследований. Так, например, использование пробирки BD Microtainer® PST™ с корпусом янтарно-желтого цвета гарантирует стабильность образцов плазмы при анализе крови на билирубин не менее 24 часов при комнатной температуре [4]. Необходимо отметить, что исследование гематологических показателей, группы крови, глюкозы и некоторых других биохимических показателей у детей возможно из капиллярной крови, но исследование показателей системы гемостаза, гормонов необходимо проводить только из венозной крови.

Отклонения от стандартов при взятии пробы, транспортировке и хранении образца, а также факторы, связанные с пациентом, могут привести к неверным или неточным результатам анализов и, следовательно, к постановке ошибочного диагноза. Мы посмотрели влияние объема полученного образца на результаты исследований. Взятие капиллярной крови производилось одновременно у одного пациента в микротейнеры с К2ЭДТА и К3ЭДТА разных производителей. Пробы были взяты с учетом рекомендаций производителей и с нарушением объема, как это часто бывает на практике (рис. 2, 3).

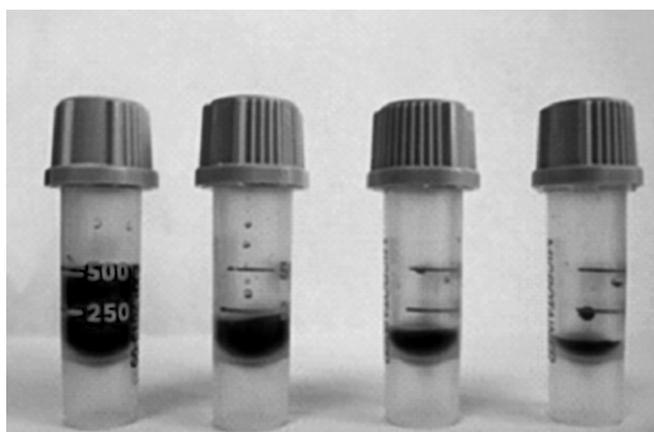


Рис. 2. Пробы с К2ЭДТА с метками для взятия 250–500 мкл крови

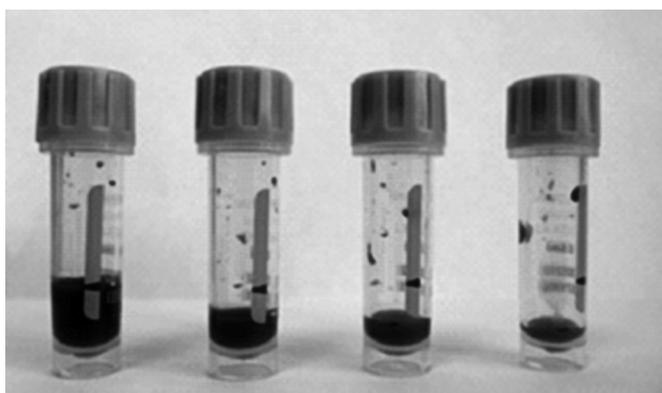


Рис. 3. Пробы с К3ЭДТА с метками для взятия 500 мкл крови

Избыток ЭДТА, независимо от концентрации, негативно воздействует на эритроциты, вызывая сначала их сморщивание, а затем с течением времени и набухание, что приводит к увеличению среднего объема и уменьшению среднего содержания гемоглобина в одном эритроците. Кроме того, использование К2ЭДТА в пробирках BD Microtainer® сопровождается отсутствием формирования микросгустков [6], а пробирка BD Microtainer® MAP с К2ЭДТА, предназначенная специально для автоматических анализаторов капиллярной крови, обеспечивает риск образования микросгустков не более 2% [6] и стабильность гематологических показателей не менее 12 часов при хранении проб при комнатной температуре [3]. При этом выявленные в ходе проведенных нами исследований нарушения наиболее выражены в пробах с К3ЭДТА. Нарушение соотношения кровь-антикоагулянт приводит к набуханию тромбоцитов и их расщеплению, что выражается в увеличении их количества, т. к. образующиеся фрагменты имеют достаточно крупные размеры и могут быть подсчитаны как нормальные кровяные пластинки. Также К3ЭДТА вызывает уменьшение общего количества лейкоцитов и их дегенеративные изменения. В связи с этим следует обращать внимание на используемый антикоагулянт, на точное соблюдение рекомендованного производителем объема образца, а также на тщательное и своевременное перемешивание пробы.

При централизации исследований взятие крови в наименьшей степени может контролироваться лабораторией. Зачастую выбор материала и места прокола осуществляется персоналом ЛПУ без учета требований лаборатории, что вынуждает отбраковывать часть образцов. В нашей лаборатории разработаны критерии отказа в проведении исследований в следующих случаях: взятый материал находится в несоответствующей пробирке (т. е. не с тем наполнителем); наличие сгустков в пробе с антикоагулянтами; несоответствие объема пробы (допускается отклонение +10%); гемолиз пробы (кроме исследований, на которые гемолиз влияния не оказывает); отсутствие штрих-кода на направлении или пробирке; отсутствие перечня исследований и т. д.

Так как процедурная медицинская сестра не входит в штат лаборатории, а за конечный результат перед пациентом отвечает именно лаборатория, необходимо выработать четкие инструкции:

- по выбору процедуры взятия крови (венозная или капиллярная);
- по выбору медицинского инструментария для взятия крови (игла с определенным диаметром, ланцет с разным типом и глубиной прокалывающего устройства);
- по выбору пробирок и микротейнеров с необходимым наполнителем;
- по последовательности их наполнения.

Немаловажным считаем обучение медицинских сестер на курсах повышения квалификации приемам и пра-

Таблица 1. Результаты сравнительного анализа гематологических показателей при взятии разного объема капиллярной крови в пробирки с К2ЭДТА

К2ЭДТА	Объем пробы, рекомендованный производителем		Нарушение объема пробы		% изменения
	500 мкл	250 мкл	120 мкл	60 мкл	
МСН	27,0	26,8	24,9	26,0	3,0
МСV	77,1	78,2	79,3	79,5	3,0
Гематокрит	33,0	33,2	33,4	33,1	0,3
Тромбоциты	170	173	180	183	7,0

Таблица 2. Результаты сравнительного анализа гематологических показателей при взятии разного объема капиллярной крови в пробирки с К3ЭДТА

К3ЭДТА	Объем пробы, рекомендованный производителем		Нарушение объема пробы			% изменения
	500 мкл	250 мкл	120 мкл	60 мкл		
МСН	27,7	27,2	27,6	26,6	4,0	
МСV	73,5	76,0	75,7	77,0	5,0	
Гематокрит	31,0	31,6	31,0	31,7	2,2	
Тромбоциты	174	180	186	186	7,0	

вилам забора капиллярной и венозной крови с использованием вакуумных систем и микротейнеров, с последующей выдачей сертификата.

Соблюдение правил преаналитического этапа позволит свести к минимуму ошибки лабораторных исследований.

Литература

1. Comparative Evaluation of the BD Microtainer® Contact-Activated Lancet (High Flow, Blue) with Other Market-leading Lancets for Blood Flow and Ease of Use during Finger Puncture Procedures // VS7607-WHITE PAPER (2008).

Comparison of BD Microtainer® Contact-Activated Lancet (Low Flow) with BD Microtainer® Genie™, LifeScan OneTouch® SureSoft™ Gentle, and SurgiLance™ One-Step PLUS Safety Lancets for Comfort, Ease of Use, and Blood Volume // VS7499-WHITE PAPER (2006).

3. A Comparison of BD Microtainer® MAP Microtube for Automated Process with the BD Microtainer® Tube with Microgard™ Closure for

Routine Hematology Testing on the Beckman Coulter® LH 750 Over Time // VS8114-WHITE PAPER (2010).

4. Comparison of BD Microtainer® PST™ Amber Tubes with BD Microgard™ Closure to BD Microtainer® PST™ Clear Tubes with FloTop Collector for visual and Total Bilirubin // VS5815 (2004).

5. Sang Hyuk Park, Hyun-Sook Chi, Mi-Ok Choi, Bora G. Park, Seongsoo Jang and Chan-Jeoung Park. Improved turnaround time for neonatal hematology profile tests (complete blood count) using a new microcollection tube // Clin. Chem. Lab. Med. 2011; 49 (6): 1083–1085.

6. Parul Singla, Anuj Anand Parkash, Jayshree Bhattacharjee. Preanalytical Error Occurrence Rate in Clinical Chemistry Laboratory of a Public Hospital in India // Clin. Lab. 2011; 57: 749–752.

7. Shah V., Taddio A., Kulasekaran K., O'Brien L., Kelly E. Evaluation of a New Lancet Device (BD QuikHeel) on Pain Response and Success of Procedure in Term Neonates // Arch. pediatr. adolesc. med. 2003; 157.

РЕАЛИЗАЦИЯ ТРЕБОВАНИЙ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА В ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ: ИЗМЕРЕНИЕ ПРОДУКЦИИ И ПРОЦЕССОВ, АНАЛИЗ И УЛУЧШЕНИЕ

Ю. В. ЭМАНУЭЛЬ¹, А. Л. ХОТИН²

¹ ГБОУ ВПО СПбГМУ имени акад. И. П. Павлова Министерства здравоохранения РФ
Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины

² Эксперт системы менеджмента качества Российской ассоциации медицинской лабораторной
диагностики

Резюме. В настоящей статье продолжается обсуждение основных требований стандарта по системам менеджмента качества ISO 9001-2008 (аналогичный российский стандарт — ГОСТ ISO 9001-2011), как основополагающего стандарта для улучшения деятельности любой организации, в том числе — и для организаций здравоохранения. В частности, рассматриваются требования по измерению, анализу и совершенствованию с целью демонстрации соответствия продукции и повышения результативности функционирования системы менеджмента качества (СМК).

Ключевые слова: системы менеджмента качества. СМК. Менеджмент качества в здравоохранении. Менеджмент качества медицинских услуг. ISO 9001-2008. ГОСТ ISO 9001-2011. Измерение, анализ, улучшение. Мониторинг и измерение процессов и продукции. Корректирующие действия. Предупреждающие действия. Внутренний аудит. Управление несоответствующей продукцией.

REALIZATION OF QUALITY MANAGEMENT SYSTEM DEMANDS IN HEALTH CARE ORGANIZATIONS: MEASUREMENT OF PRODUCTS AND PROCESSES, ANALYSIS AND IMPROVEMENT

JU. V. EMANUEL¹, A. L. KHOTIN²

¹ State budget educational institution of higher professional education
“Saint-Petersburg State Pavlov Medical University” Ministry of Health Care of Russian Federation
Clinical laboratory diagnosis department with a course of molecular medicine

² Expert of quality management system of Russian Association of medical laboratory diagnosis

Summary. Present article continues the discussion of the main demands of standard for quality management systems ISO 9001-2008 (Russian standard — ГОСТ ISO 9001-2011) as a main standard for improvements in organization activity in any field including health care. The demands for measurement, analysis and improvement are discussed. The main target for the discussion is to improve the results of quality management system use.

Key words: Quality management system, quality management system in health care, management of medical services quality, ISO 9001-2008. ГОСТ ISO 9001-2011. Measurement, analysis, improvement. Monitoring and measurement of processes and production. Correction actions. Preventive actions. Intrinsic audit. Management of insufficient production.

Данные для корреспонденции:

Эмануэль Юлия Владимировна, к. м. н., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, ГБОУ ВПО СПбГМУ имени акад. И. П. Павлова
Министерства здравоохранения РФ
197022, ул. Льва Толстого, 6/8, e-mail: ejvcons@mail.ru

Введение

В предыдущих работах [1], [2], [3] мы обсуждали, как в соответствии с требованиями стандарта ISO 9001-2008 [4] разрабатывать систему менеджмента качества и управлять с её помощью процессами создания продук-

ции. Однако для эффективного функционирования организации, кроме управления производственными процессами, стандарт (раздел 8) требует ещё и дополнительного внедрения процессов мониторинга, измерения, анализа и совершенствования, необходимых для:

- измерения продукции с целью определения соответствия её установленным требованиям (техническим, эксплуатационным и иным характеристикам и параметрам, которые были заявлены как отличительные свойства данной продукции);
- обеспечения соответствия СМК установленным к ней требованиям и непрерывного совершенствования её результативности.

Таким образом, здесь говорится уже о полном контроле и продукции, и всех элементов СМК, что, естественно, требует дополнительных усилий и затрат. Однако следует заметить, что очень часто явно недооценивается роль таких измерений и контроля, которые, по существу, представляют собой не что иное, как доказательную базу, необходимую в самых различных ситуациях. Так, например, измерение продукции является основанием как для проведения в организации корректировочных мероприятий по созданию продукции, так и для доказательства потребителю, что поставляемая ему продукция соответствует установленным требованиям. А измерение процессов и других элементов СМК служит не только доказательством эффективности и результативности процессов, но и является основанием для улучшений производственной деятельности в организации и самой СМК. Таким образом, основной смысл этого требования становится понятным из известного выражения «Управлять можно только тем, что можно измерить» [5].

Заметим, что для большинства организаций здравоохранения продукцией являются предоставляемые населению разнообразные услуги по диагностике, лечению, профилактике заболеваний и иным связанным с ними проблемам. Процессы измерения таких услуг (по сравнению с измерением других видов продукции, например, товаров), имеют свои особенности, на которые и будет обращено особое внимание.

Далее мы рассмотрим требования по всем видам мониторинга, измерений, анализа и улучшений в такой же последовательности, как они приведены в стандарте ISO 9001-2008, а также реализацию этих требований применительно к оказываемым услугам. И ещё раз отметим, что данные требования являются обязательными при разработке и внедрении СМК.

1. Удовлетворение потребителя

Данный параметр свидетельствует прежде всего о потребительских свойствах услуги и о восприятии её потребителем. Возникает вопрос: в чем смысл данного требования и какие несоответствия здесь могут быть? Конечно же, перед началом оказания услуги в организации проводятся маркетинговые исследования и определяются запросы потребителей, а в процессе оказания услуги проводятся различные измерения установленных для неё характеристик (контроль качества). И также предполагается, что потребителю предоставляются только годные (соответствующие установленным требо-

ваниям) услуги. Однако в данном случае возможны следующие ситуации:

- 1) При оказании услуги выполняются не все установленные к ней требования (требования, обещанные потребителю). Например, не соответствует время обслуживания пациентов или время исследования анализов, не соответствует стоимость услуги.
- 2) Уже после предоставления услуги выясняются какие-либо её недостатки (например, ухудшение самочувствия пациента).
- 3) У потребителей могут возникать какие-либо проблемы при использовании полученной продукции (например, наличие неудобств при эксплуатации протезов или ортезов, сложности при их техническом обслуживании).
- 4) Сам процесс оказания услуги также может не соответствовать ожиданиям потребителей (например, несоответствующий уровень сервиса и комфорта при обслуживании пациентов).

Нередки и такие ситуации, как, например:

- поставка медикаментов с истекшим сроком годности;
- недостаточная информация пациентов о порядке приема медикаментов;
- отсутствие указаний о действиях пациентов в каких-либо экстренных случаях уже после предоставления услуги (после лечения, после приема процедуры);
- несоответствие компетенции персонала, занимающегося оказанием услуг (при непосредственной работе с пациентами).

В каждом из рассмотренных случаев продукция фактически была уже поставлена потребителю (т.е. переданы какие-либо изделия или оказана какая-либо услуга). И хотя до поставки такая продукция в самой организации подвергалась проверке и была признана соответствующей, однако для потребителя она оказалась несоответствующей его ожиданиям. Поэтому в данном случае закон стоит на стороне потребителя. В связи с этим стандарт требует, чтобы организация разработала и внедрила методы получения и дальнейшего использования информации об удовлетворенности потребителей.

К таким методам могут относиться:

- опросы потребителей о качестве обслуживания;
- открытие телефонов «горячей линии»;
- контроль состояния пациентов после оказания услуг (контрольные и профилактические обследования, контроль функционирования медикотехнической продукции);
- сбор пожеланий фактических и потенциальных потребителей;
- проведение «дней открытых дверей» и «конференций по здоровью» для населения и др.

При этом должен быть установлен порядок сбора такой информации и принятия необходимых мер для устранения выявленных недостатков и учета пожеланий.

В любом случае данная информация не только поможет улучшить предоставляемые услуги, но позволит завоевать доверие потребителей.

2. Внутренний аудит

Внутренний аудит — это проверка функционирования СМК, проводимая силами самой организации (самопроверка). Стандарт устанавливает следующие основные требования к проведению внутренних аудитов:

1) Внутренние аудиты должны проводиться периодически на плановой основе, причем программа аудита должна планироваться с учетом статуса и важности проверяемых объектов.

2) Устанавливается порядок проведения внутренних аудитов (критерии и объем проверки, периодичность, методы, ответственность, записи, представление результатов).

3) Устанавливается порядок проведения всевозможных корректирующих действий в тех подразделениях, где выявлены несоответствия.

4) По результатам выполнения корректирующих действий проводится повторная проверка.

5) Должна быть обеспечена независимость, объективность и беспристрастность аудита.

Как правило, в больших организациях имеется специальный штат (несколько человек) внутренних аудиторов, которые постоянно работают в подразделении качества. И при этом они подчиняются непосредственно руководителю по качеству, который, в свою очередь, подчиняется непосредственно руководителю организации. Таким образом обеспечивается независимость и объективность аудита.

В небольших организациях (с меньшим объемом аудиторских проверок) существует практика, когда собирают группу внутренних аудиторов из числа работников разных подразделений, которые осуществляют аудиторскую деятельность под началом руководителя по качеству. Такие работники привлекаются для проведения внутренних аудитов лишь эпизодически, поскольку основное их время занято выполнением своих профессиональных обязанностей. Причем устанавливается правило, согласно которому такой работник (внутренний аудитор) не может проверять то подразделение, в котором он работает, что гарантирует беспристрастность аудита.

Обычно подготовку внутренних аудиторов в организации проводит руководитель по качеству в соответствии с рекомендациями стандарта ISO 19011-2002 [6], или такая подготовка может проводиться в специализированных организациях (например, в Органе по сертификации). По результатам проведения внутренних аудитов осуществляется оценка состояния СМК и предлагаются меры по её корректировке и улучшению.

3. Мониторинг и измерения процессов

По сравнению с измерением, например, объектов, характеризующихся различными физическими величина-

ми (расстояние, мощность, время и т. д.), измерение процессов является непривычным. Как известно, измерение представляет собой определение отношения одной измеряемой величины к другой однородной величине, принятой за единицу, выполняемое в соответствии с метрикой, характеризующей данное пространство измерений. Поэтому суть измерения процессов заключается в том, чтобы связать с измеряемым процессом некий набор метрик — технически или процедурно измеряемых величин, которые и будут характеризовать данный процес [7]. Таким образом, это один из наиболее сложных видов измерений, поскольку касается глубокого изучения функционирования каждого процесса. Хотя стандарт требует лишь измерять и оценивать способность процессов достигать запланированных результатов (результативность процесса), однако сложность заключается, в первую очередь, в выборе измеряемых параметров процессов (системы метрик) и критериев оценки.

Очень часто такими измерениями вообще не занимаются, а оценивают функционирование организации лишь в целом — по некоторым запланированным обобщенным показателям, например: числу обслуженных пациентов, количеству выполненных анализов, количеству произведенных медикаментов (в единицу времени) и т. д. Однако, если при этом окажется, что фактические показатели хуже запланированных, то становится неясно, какие меры следует применять, поскольку такие обобщенные показатели являются следствием одновременного действия многих процессов. Поэтому только конкретные критерии и фактически измеренные параметры самих процессов позволят быстро выявить в них несоответствия, а также провести необходимые корректировки процессов.

Когда обсуждались вопросы разработки процессов [2], то рассматривались различные элементы, составляющие какой-либо процесс, например: последовательность выполнения подпроцессов (элементарных действий, составляющих данный процесс), взаимодействие персонала при выполнении работ, порядок использования оборудования, материалов и других видов ресурсов, порядок взаимодействия данного процесса с другими процессами и т. д. И, в принципе, каждый из этих элементов может оказывать влияние на протекание процесса, а значит, и влияние на качество продукции. И именно в таком многообразии различных элементов (влияющих на качество процесса) заключается некоторая сложность в определении критериев результативности процессов.

Рассмотрим в качестве примера следующую ситуацию в процессе выполнения анализа крови, когда происходит частичное искажение результата анализа. Данное несоответствие процесса может возникать, например, по следующим причинам:

- недостаточно настроено или откалибровано лабораторное оборудование;

- условия хранения проб крови приводят к частичному их повреждению, которое невозможно сразу определить;
- используемые при проведении анализа ингредиенты обладают невысоким качеством;
- допускаются неточности в работе лаборанта из-за его большой производственной загрузки и нехватки времени на проведение единичного исследования, или из-за недостаточной освещенности рабочего места;
- некорректно составлено методическое руководство по проведению анализа (например, не учтена какая-либо редко возникающая ситуация) и другое.

Естественно, что процесс при этом является «нерезультативным», поскольку он не достигает запланированного результата. Однако быстро определить и устранить несоответствие в данном случае часто бывает затруднительно. И только систематический контроль специально подобранных параметров процесса позволит выявить в нём несоответствия и причины их возникновения.

Поскольку часто путают понятия «измерение процесса» и «измерение продукции», то часто считают излишним проводить дополнительно измерение параметров процессов, полагая достаточным проводить только измерение или контроль продукции. Однако такая точка зрения представляется ошибочной по следующим причинам:

1) Не все процессы (присутствующие в организации) участвуют в непосредственном создании продукции — некоторые из них имеют к продукции лишь косвенное отношение. А значит, невозможен пооперационный контроль продукции в этих процессах. Однако в то же время эти процессы могут оказывать очень заметное влияние на качество создаваемой продукции. Например, процесс «управление закупками» (при закупке необходимых для проведения анализа ингредиентов) также может влиять на качество проведения анализа крови.

2) Не всегда можно осуществить частый контроль продукции на этапах её создания.

Например, в процессе лечения (где необходимо выполнение ряда промежуточных процедур) иногда контроль результатов лечения производят лишь на завершающем этапе, когда действительно могут быть отмечены положительные улучшения. Однако результаты лечения зависят от качества выполнения промежуточных этапов.

3) Положительные результаты измерения качества продукции (товаров медицинского назначения или медицинских услуг) не всегда свидетельствуют о качестве самого процесса.

Действительно, в конечном счете, все выявленные на выходном контроле несоответствия могут быть устранены (пациент будет вылечен, или поставляемая продукция медицинского назначения будет только годной), однако факт наличия несоответствий может свидетельствовать уже о некоторых отклонениях самого процесса. Такие отклонения (как отмечено выше) могут возникать

по разным причинам. И устранение увеличивает финансовые затраты на реализацию процессов.

Как решать данную проблему и какие при этом выбрать критерии для контроля процессов? Во-первых, совершенно очевидно, что необходимо в отдельности оценивать каждый процесс. Во-вторых, для оценки каждого процесса необходимо ввести свои особые критерии, которые, в общем случае, для каждого процесса могут отличаться. Вот некоторые примеры критериев оценки процессов:

1) Для процесса «Обслуживание пациента» можно контролировать:

- время обслуживания у конкретного врача;
- время наступления улучшений самочувствия после посещения врача (по опросу пациентов);
- количество повторных обращений пациентов по данному заболеванию (в единицу времени).

2) Для процесса «Выполнение лабораторных анализов» можно контролировать:

- время исследования;
- условия эксплуатации и хранения оборудования и материалов;
- ресурсные затраты по процессу исследования.

3) Для некоторых процессов по изготовлению медикаментов можно контролировать:

- количество медикаментов, изготовленных в единицу времени;
- количество зарегистрированных несоответствий в единицу времени;
- условия эксплуатации и хранения оборудования и материалов.

4) Для процесса по управлению документацией можно контролировать:

- время по управлению обращением документации на отдельных этапах (время актуализации действующей документации, время разработки, проверки и утверждения новой документации);
- количество несоответствий при электронном документообороте.

Естественно, что в приведенных примерах представлены лишь некоторые из возможных параметров для конкретных процессов. И чем больше параметров будет выбрано для контроля, тем более «чувствительным» будет контроль. При этом важно, чтобы среди таких параметров были те, которые в наибольшей степени характеризуют результаты процесса.

В заключение этого раздела ещё раз отметим основной смысл данного требования стандарта: результативность процесса указывает в первую очередь на качество его организации (качество структурирования процесса, условий проведения и т. д.).

4. Мониторинг и измерение продукции

Данное требование направлено на контроль выполнения всех установленных для продукции характеристик, поскольку довольно часто в разных сферах деятель-

ности можно наблюдать несоответствие фактически получаемых характеристик изначально установленным. Для оптимального выполнения контроля необходимо определить:

- наиболее важные этапы в создании продукции, где требуется проводить контроль;
- перечень контролируемых параметров на каждом из этапов;
- программы и методики контроля;
- ресурсы для проведения контроля;
- ответственных должностных лиц для проведения контроля.

Все указанные действия должны быть запланированы, результаты контроля должны регистрироваться, а продукция предоставляться потребителю только при положительных результатах контроля.

При создании товаров (медикаментов, медико-технических изделий и т. д.) порядок контроля таких видов продукции является хорошо разработанным и основан, как правило, на измерении физических параметров или химических свойств продукции. Однако при оказании медицинских услуг иногда могут возникать сложности в оценке качества такой продукции, поскольку (как и в случае измерения процессов) здесь необходимо выбрать особую систему метрик, характеризующую такую продукцию. Кроме того, в отличие от товара, услуга предоставляется (передается) потребителю не «после её создания», а непосредственно «в момент создания». Как поступать в этом случае? Как известно, услуга характеризуется «спецификацией», содержащей набор выполняемых действий. Поэтому уже в процессе предоставления услуги можно контролировать, например: полноту предоставления всех составляющих услуги, выполнение отдельно каждой из составляющих (время обслуживания, качество выполнения, обобщение результатов обследования, наличие и характер возможных несоответствий, иные характеристики каждой конкретной составляющей услуги). Таким образом, можно контролировать соответствие услуги установленным требованиям и, в случае обнаружения отклонений от установленного процесса, незамедлительно производить соответствующие коррекции. Конечно, такой поэтапный контроль существенно повышает гарантии качества услуги, однако это не отменяет также и проведения общей оценки качества услуги уже после её предоставления. Действительно, в отдельных случаях даже при положительных результатах контроля отдельных действий, составляющих услугу, в конечном счете услуга может оказаться не соответствующей (например, когда после проведенного лечения выяснится его неэффективность).

5. Управление несоответствующей продукцией

К несоответствующей продукции (товарам или услугам), в общем случае, может относиться: готовая продукция, продукция, находящаяся на промежуточных этапах создания, а также продукция, которая уже была ранее

поставлена потребителю. В случае предоставления медицинской услуги здесь рассматривается либо уже предоставленная услуга, либо какой-то из промежуточных этапов услуги. Целью управления несоответствующей продукцией является предотвращение непреднамеренного использования её в производстве или поставки потребителям. Для этого необходимо выполнение следующих действий:

- выявление, идентификация и изоляция несоответствующей продукции;
- обследование несоответствующей продукции и принятие решения по выполнению дальнейших действий с ней;
- проведение необходимых действий с несоответствующей продукцией.

В зависимости от обстоятельств организация может поступать с несоответствующей продукцией одним из следующих способов:

1) Принять действия по устранению обнаруженного несоответствия. При этом после устранения несоответствий продукция должна быть вновь перепроверена для демонстрации её пригодности.

2) Разрешить использование продукции с отступлениями от первоначально установленных требований (если имеется согласованное решение с потребителем или иным ответственным лицом). Например, если по какой-то причине проведено неполное обследование пациента (из-за дефектов медицинского оборудования, отсутствия ингредиентов для выполнения анализа, вследствие собственного желания пациента и т. д.), то по согласованию с пациентом (а при необходимости — и с лечащим врачом) обследование может быть на этом завершено.

3) Предотвращать действия по первоначальному предполагаемому использованию продукции. Однако в отдельных случаях продукция, которая не соответствует первоначально установленным требованиям, может быть использована совершенно по другому назначению (данное решение возможно только для товарной продукции).

4) Предпринять действия, адекватные ущербу, если несоответствие продукции выяснилось уже после её поставки (например, возмещение ущерба за несоответствующее медицинское обслуживание).

Все выявленные несоответствия, а также последующие действия с несоответствующей продукцией должны регистрироваться, включая: данные по устранению несоответствий, замене несоответствующей продукции на годную, оформление разрешения на отступление от первоначально установленных требований, оформление разрешения для использования по иному назначению, составление акта о компенсации ущерба.

Для изоляции несоответствующей продукции (товаров) от годной используют её обособленное хранение, предотвращающее возможность её непреднамеренного использования. Изоляция продукции, представляющей собой медицинскую услугу, может производиться, например, временным приостановлением процесса оказа-

ния услуги и, при необходимости, изъятием материалов делопроизводства по оказанию данной несоответствующей услуги из общего документооборота (например, изъятие и постановка на контроль и проверку амбулаторной или больничной карты, зарегистрированных записей лабораторного исследования и т. д.).

Наличие документированной процедуры по управлению несоответствующей продукцией является обязательным требованием стандарта.

6. Анализ данных

В результате функционирования СМК в организации формируется большое количество самых различных данных о деятельности организации и о самой СМК. Эти данные представляют собой регистрационные записи по выполнению процессов, контролю и измерениям продукции, взаимодействию с потребителями, поставщиками и другие. Таким образом, формируемые данные являются объективными свидетельствами истинного состояния всех элементов производственной деятельности, на основании чего производится их оценка и совершенствование. Конечно, работа по комплексной оценке производственной деятельности в той или иной степени проводится в каждой организации, однако не всегда такая оценка является эффективной, поскольку оценивать следует не только деятельность организации или качество продукции, но и пригодность и результативность СМК в целом. Такая оценка должна производиться на основе анализа всех полученных данных. При этом целесообразно, чтобы проведение этого анализа (как процесса) было регламентировано соответствующими документами, в которых бы содержались: методика сбора и обработки информации по всем элементам СМК, порядок рассмотрения данных и их оценивания (включая критерии оценки), а также порядок представления результатов анализа высшему руководству для принятия адекватных решений в области качества.

7. Совершенствование

7.1. Непрерывное совершенствование

Как известно, непрерывно меняющиеся внешние условия вынуждают любую организацию также корректировать и свою деятельность. Причем такие коррекции могут осуществляться только на основе объективных данных, которые формируются в результате функционирования СМК, охватывающей все элементы производственной деятельности. Таким образом, функционирование СМК направлено не только на выявление и устранение несоответствий, но также и на проведение улучшений деятельности всей организации. А это предполагает, в первую очередь, совершенствование самого порядка функционирования СМК и должно быть направлено на повышение эффективности и результативности СМК. Методологическую основу по улучшению деятельности составляют: политика и цели в области

качества, результаты аудитов, анализ всех данных, корректирующие и предупреждающие действия, а также анализ со стороны руководства.

7.2. Корректирующие действия

Корректирующие действия проводятся с целью устранения выявленных несоответствий, а также для принятия мер по предупреждению их возможного повторного возникновения. Корректирующие действия проводятся на основании анализа несоответствий по результатам всех видов контроля, испытаний и проверок, а также жалоб потребителей (пациентов).

Наличие документированной процедуры по корректирующим действиям является одним из основных требований стандарта. В процедуре должен быть установлен порядок:

- анализа выявленных несоответствий;
- определения причин несоответствий;
- оценки потребности в корректирующих действиях и определения их содержания;
- реализации корректирующих действий;
- регистрации результатов выполнения корректирующих действий;
- анализа результативности предпринятых корректирующих действий.

Таким образом, для реализации данной процедуры в организации должны быть налажены систематические сбор, обработка и анализ выявленных несоответствий продукции на всех этапах её создания, а для анализа выявленных несоответствий следует привлекать наиболее опытных работников организации. По результатам анализа составляется план корректирующих действий, и далее не только контролируется их выполнение, но и производится оценка результативности предпринятых действий. Для оценки результативности должна быть разработана методика, содержащая, в том числе, и критерии оценки.

Если по результатам оценки устанавливается, что корректирующие действия не достигли поставленных целей, то принимается решение о проведении повторных корректирующих действий. Повторные корректирующие действия могут производиться неоднократно — до полного устранения выявленных несоответствий.

Все мероприятия по корректирующим действиям, начиная от выявления несоответствия и до окончательного подтверждения результативности предпринятых корректирующих действий по его устранению, должны быть зарегистрированы.

7.3. Предупреждающие действия

Предупреждающие действия проводятся с целью устранения причин *потенциальных несоответствий* для предотвращения их возникновения. В отличие от корректирующих действий, которые бывают инициированы конкретно выявленными несоответствиями, для проведения предупреждающих действий требуется *постоян-*

но проводить тщательный анализ всех элементов производственной деятельности организации, даже в те периоды, когда организация нормально функционирует и, казалось бы, нет никаких причин для ухудшения её деятельности. Однако на самом деле, все внутренние и внешние факторы и обстоятельства, сопровождающие производственную деятельность, с течением времени в той или иной степени изменяются, что в конечном счете (потенциально) может привести к несоответствиям.

Наличие документированной процедуры по предупреждающим действиям является одним из основных требований стандарта. В процедуре должен быть установлен порядок:

- выявления и установления потенциальных несоответствий;
- оценки потребности в предупреждающих действиях и определения их содержания;
- реализации предупреждающих действий;
- анализа результативности предупреждающих действий;
- регистрации выполнения предупреждающих действий.

Выявление потенциальных несоответствий является сложной по объему и содержанию работой, основанной на анализе данных о качестве по всем элементам СМК, в том числе:

- данных о качестве продукции (в том числе — медицинских услуг) и процессов её создания;
- результатов различных проверок по качеству;
- претензий и отзывов потребителей (пациентов);
- результатов рабочих совещаний по проблемам в области качества;
- результатов анализа СМК руководством организации.

Далее производится оценка выявленных потенциальных несоответствий и изучение причин их появления. Если будет установлено, что причины потенциальных несоответствий являются актуальными и обладают высокой вероятностью появления, а также вызванные ими потенциальные несоответствия могут иметь значительные негативные последствия для организации, то принимается решение о проведении предупреждающих действий для их устранения. Таким образом, работа по выявлению потенциальных несоответствий должна являться одной из приоритетных в организации, и в эту деятельность должны быть вовлечены работники всех структурных подразделений.

По результатам анализа составляется план проведения предупреждающих действий, и далее не только контролируется их выполнение, но и производится оценка результативности предпринятых действий. Для оценки результативности предупреждающих действий должна быть разработана методика, содержащая, в том числе, критерии оценки. Если по результатам оценки будет установлено, что предпринятые предупреждающие действия не достигли поставленных целей, то разраба-

тывается новый план, и предупреждающие действия проводятся повторно. Повторные предупреждающие действия могут производиться неоднократно — до полного устранения выявленных потенциальных несоответствий. Все мероприятия по предупреждающим действиям, начиная от выявления потенциального несоответствия и до окончательного подтверждения результативности предпринятых предупреждающих действий по его устранению, должны быть зарегистрированы.

Заключение

Мы завершили рассмотрение основных требований стандарта ISO 9001-2008, а также некоторые особенности его применения в организациях здравоохранения. На самом деле никаких существенных особенностей здесь нет — просто в отдельных случаях, на первый взгляд, бывает трудно унифицировать элементы некоторой деятельности и сопоставить её с установленными требованиями, которые в стандарте сформулированы в самом общем виде, поскольку стандарт одинаково применим для любых организаций и видов деятельности.

Как известно, в организациях здравоохранения в значительной степени разработаны и применяются стандарты в области профессиональной деятельности, основанные на современных достижениях медицинской науки и технологии. И, как правило, этому же соответствует и высокий профессиональный уровень медицинских работников. Однако при создании продукции (товаров медицинского назначения или медицинских услуг) всё-таки может возникать значительное число несоответствий, обусловленное такими факторами, как: несоординированность действий при выполнении отдельных процессов, недостаточное внимание к контролю качества продукции, недостаточное внимание к выполнению ряда процессов (которые лишь косвенно связаны с созданием продукции), а также недостаточность данных по качеству. Именно данные пробелы и призван восполнить стандарт ISO 9001-2008, внедрение которого должно прежде всего повысить эффективность работы любой организации здравоохранения.

Литература

1. Эмануэль Ю. В., Хотин А. Л. Применение системы менеджмента качества в организациях здравоохранения // Клинико-лабораторный консилиум, 2009; 2 (27): 4–12.
2. Эмануэль Ю. В., Хотин А. Л. Особенности разработки и внедрения системы менеджмента качества в организациях здравоохранения // Клинико-лабораторный консилиум, 2009; 3 (28): 22–30.
3. Эмануэль Ю. В., Хотин А. Л., Эмануэль А. В. Основные требования системы менеджмента качества и особенности их реализации в организациях здравоохранения // Клинико-лабораторный консилиум, 2009; 6 (31): 8–15.
4. ISO 9001–2008. Системы менеджмента качества. Требования.
5. Качалов В. А. Что такое «мониторинг» и «измерение процесса»? // Методы менеджмента качества, 2008; 1–2.
6. ISO 19011–2002. Руководство по аудитам систем качества и экологического менеджмента.
7. Исайченко Д. Измерение процессов управления ИТ. Открытые системы. СУБД, 2011; 7.

СИНДРОМ КАВАСАКИ В ПРАКТИКЕ ПЕДИАТРА И ИНФЕКЦИОНИСТА

М. К. БЕХТЕРЕВА

ФБГУ НИИДИИ ФМБА России, ГБОУ ВПО СПб ГПМУ Минздрава России

Данные для корреспонденции:

М. К. Бехтерева, старший научный сотрудник отдела кишечных инфекций
ФБГУ «НИИДИ ФМБА России», доцент кафедры инфекционных заболеваний у детей ФПК и ПП,
e-mail: mkbechtereva@mail.ru

Лекция

Болезнь Kawasaki (синдром Kawasaki, острый детский лихорадочный кожно-слизисто-лимфатический синдром, *miscutaneolitis lymph node syndrome*) — остро протекающее системное заболевание неизвестной этиологии, с преимущественным поражением мелких, средних, в том числе коронарных артерий, в виде деструктивно-пролиферативного васкулита, характеризующееся лихорадкой, конъюнктивитом, поражением слизистой оболочки полости рта и зева, экзантемой и увеличением шейных лимфатических узлов. Шифр МКБ-10 — М30.3 — слизисто-кожный лимфонодулярный синдром (Kawasaki).

Из этого определения следует, что данная нозология относится к системным васкулитам и, следовательно, ревматологическим заболеваниям. Однако с синдромом Kawasaki первыми встречаются педиатры и инфекционисты и именно они должны заподозрить данное заболевание и провести адекватную терапию, так как вовремя назначенная этиопатогенетическая терапия позволяет в 4–5 раз снизить риск развития аневризм коронарных артерий и как следствие предотвратить развитие инфаркта миокарда и коронарную смерть.

К настоящему времени в РФ сформировалось две школы детских кардиоревматологов, занимающихся изучением болезни Kawasaki: иркутская под руководством профессора Л. В. Брегель и московская — профессора Г. А. Лыскиной. К сожалению, в других регионах России мало внимания уделяют этой проблеме. Автору этой публикации лично приходилось слышать высказывания детских кардиоревматологов, что болезни Kawasaki в Санкт-Петербурге нет, а предложение, обращенное к врачам ультразвуковой диагностики, выполнить ребенку ультразвуковое исследование коронарных артерий вызывало только смех.

Эпидемиология. Болезнь Kawasaki впервые описана педиатром Т. Kawasaki в 1967 году. В настоящее время болезнь Kawasaki диагностируется в 48 странах мира: Японии, Корее, США, Канаде, Германии, Финляндии, Франции, Великобритании, Новой Зеландии, Австралии, Тайване, Швеции, Нидерландах, странах Центральной

и Южной Америки. В России первый случай заболевания наблюдался в 1980 г., описан в 1982 г., в настоящее время основная масса случаев болезни Kawasaki регистрируется в Иркутске и Москве.

Заболеваемость болезнью Kawasaki у детей в возрасте до 5 лет в Японии составляет 112 на 100 тыс. детского населения; в США этот показатель достигает 17–18 на 100 тыс. детского населения, причем наиболее часто болеют азиаты (32,5 на 100 тыс. детского населения), на втором месте лица негроидной расы — 16,9 на 100 тыс. детского населения, далее — латиноамериканцы — 11,1 на 100 тыс. детского населения, и реже всего заболевание встречается у представителей белой расы (9,1 на 100 тыс. детского населения). По данным Л. В. Брегель (Иркутск), расчетная частота встречаемости болезни Kawasaki в РФ — 4,4 на 100 тыс. детей в возрасте до 5 лет.

Мальчики болеют в 2 раза чаще девочек, большинство случаев встречается у детей в возрасте 2 лет (80–90%). Болезнь Kawasaki регистрируется в течение всего года, отмечается зимне-весенняя сезонность, основные подъемы приходится на январь и июнь–июль.

В настоящее время нет убедительных данных о том, что болезнь Kawasaki передается от человека к человеку. В Японии от 1,5 до 2% описанных случаев заболевания наблюдались у двух сиблингов, и у 50% из них заболевание началось последовательно (у второго — в течение 7 дней после начала заболевания у первого), в то же время описано несколько вспышек заболевания, преимущественно в Азии. У детей, имеющих братьев и сестер с болезнью Kawasaki, риск заболевания повышается в 10 раз, а при наличии в анамнезе у родителей болезни Kawasaki — риск заболеть повышается в 2 раза. В Японии частота рецидивов болезни достигает 3%.

Этиология. Несмотря на интенсивные исследования, этиология болезни Kawasaki до сих пор остается неизвестной. В пользу инфекционного генеза болезни свидетельствуют: эпидемические вспышки заболевания, сезонность, случаи заболеваний у близких родственников, географические особенности распространения

заболевания, способность самопроизвольного выздоровления, редкое развитие рецидивов, а также симптоматика, характерная для инфекционных нозологий (лихорадка, экзантема, энантема, конъюнктивит, лимфоаденопатия). Однако подверженность заболеванию лиц мужского пола и высокая его частота среди детей раннего возраста в Японии и лиц японского происхождения свидетельствуют против этого предположения.

Существует гипотеза, что болезнь Kawasaki вызывается повсеместно распространенным инфекционным агентом, но симптомы заболевания развиваются только у генетически предрасположенных лиц, в частности у азиатов. Низкая заболеваемость у детей первых 6 месяцев жизни, возможно, связана с пассивной иммунизацией антителами, полученными от матери, а взрослое население не болеет ввиду наличия иммунитета.

Долгое время рассматривалась этиологическая роль следующих возбудителей: стрептококков (установлено повышение титров антистрептококковых антител у части пациентов с болезнью Kawasaki); иерсиний (патогенные иерсинии выделялись из фекалий, обнаруживались диагностические титры антител у отдельных больных); вируса Эпштейна–Барр (выявлялся у значительного числа пациентов в течение 3 месяцев после начала болезни), кроме этого, изучалась роль коронавируса, ротавирусов; аденовирусов 3-го типа; вирусов простого герпеса; вирусов ЕСНО 11, но все эти данные не нашли своего подтверждения.

Патогенез. Гипотеза патогенеза болезни Kawasaki формулируется следующим образом: иммунная восприимчивость к болезни Kawasaki является скорее олигоклональной (антиген-зависимой), чем поликлональной (характерной для восприимчивости суперантигена), в этом процессе ведущую роль играют плазматические клетки, вырабатывающие иммуноглобулин А (IgA). Массивная инфильтрация верхних дыхательных путей плазматическими клетками при болезни Kawasaki сходна с обнаруживаемой при тяжелых вирусных инфекциях. Следовательно, можно предположить, что этиологический агент, вызывающий болезнь Kawasaki, проникает в организм через верхние дыхательные пути. Вырабатываемые при этом ферменты, в том числе металлопротеиназы, способны нарушать целостность стенок артерий. Важную роль в развитии васкулита, вероятно, играют фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), фактор активации и хемотаксиса моноцитов (MCAF, MCP-1). В острую фазу болезни Kawasaki происходит активация Т-клеток с продукцией провоспалительных цитокинов, в первую очередь ФНО- α . Локальная продукция ФНО- α в эндотелии ведет к деструкции экстрацеллюлярного матрикса и индукции выработки металлопротеиназы 9 (ММП 9), запускающей деградацию эластина, что является признаком формирования аневризмы.

Гистологические находки при болезни Kawasaki характеризуются панваскулитом с некрозом эндотелия

и диффузной мононуклеарной инфильтрацией в стенках мелких и средних артерий. Выделены патоморфологические стадии заболевания (Oshio G., 1985): стадия 1 (0–12 день) — острый васкулит микрососудов и артерий малого калибра, а также острая периваскулярная реакция и эндартериит крупных артерий, указанные изменения выражены в венечных артериях; стадия 2 (12–25 день) — панваскулит и формирование аневризм в коронарных артериях с исходом в тромбоз и локальную обструкцию; стадия 3 (26–40 день) — появляются грануляции в стенках и периваскулярном ложе артерий среднего калибра, особенно в коронарных, в то же время происходит регресс воспаления в микрососудах и мелких артериях; стадия 4 (с 40 дня и далее) — рубцевание и утолщение интимы, кальцификация, формирование тромбов, реканализация первично тромбированных крупных артерий. Артериит особенно резко выражен и часто наблюдается в коронарном русле и подвздошных артериях, однако большинство ветвей аорты (мезентериальные, почечные, подключичные, сонные, печеночная) также могут быть вовлечены в патологический процесс.

Формирование аневризм в главных коронарных артериях является наиболее характерным признаком заболевания: обычно у 20–25% больных без лечения и у 4% при своевременной терапии развиваются коронарные повреждения; аневризмы периферических артерий обычно сопутствуют коронарным аневризмам. Наблюдаются интерстициальный миокардит, перикардит, воспаление синусового узла и атриоventрикулярной проводящей системы, вальвулит.

Существует предположение, что васкулит при болезни Kawasaki предрасполагает к преждевременному развитию атеросклероза.

Симптомы и течение. Болезнь Kawasaki относят к лихорадочным заболеваниям. Инкубационный период неизвестен. Течение болезни Kawasaki может быть разделено на стадии: острая фебрильная (1–11 день), подострая (11–21 день), выздоровление (21–60 день) и хроническая, которую выделяют только у больных с сердечными осложнениями. Диагностические клинические критерии болезни Kawasaki: лихорадка 5 дней и более; и присутствие как минимум 4 из 5 симптомов: двусторонняя инъектированность сосудов конъюнктивы без образования экссудата, патологические изменения слизистых оболочек губ и полости рта (эритема, трещины губ, «клубничный язык»), распространенная инъектированность слизистых оболочек полости рта и глотки; симптомы со стороны конечностей: в острую фазу эритема ладоней, подошв, отек кистей и стоп, а в подострую фазу — околонуговое шелушение пальцев рук и ног; полиморфная эритема и экзантема; шейная лимфоаденопатия (увеличен чаще один лимфоузел более 1,5 см в диаметре), обычно односторонняя.

Для лихорадки характерно ремитирующее течение с высокими пиками и резистентностью к антимикробной терапии, температура повышается до 39–40 °С, ее дли-

тельность составляет 1–2 недели, но может затягиваться и до 3–4 нед. При условии адекватной терапии лихорадка купируется в течение 2 суток. Продолжительная лихорадка является фактором риска развития пораженных коронарных артерий.

Вышеперечисленные клинические признаки болезни Kawasaki не проявляются в одно и то же время, и требуется внимательное наблюдение за пациентом в течение нескольких суток, чтобы иметь возможность поставить правильный диагноз.

Двусторонняя инъектированность сосудов конъюнктивы глазных яблок и век выявляется более чем у 90% больных, ее можно выявить сразу после начала лихорадки. Инъектированность обычно не сопровождается гнойным отделяемым, безболезненна, отмечается светобоязнь. При исследовании на щелевой лампе можно выявить иридоциклит или передний увеит.

Изменения слизистых оболочек губ и полости рта являются ярко выраженными: эритема, трещины губ, кровотечения из трещин, «малиновый или клубничный язык» с выступающими сосочками, распространенная инъектированность слизистых оболочек полости рта и глотки сохраняются в течение 7–14 дней.

Экзантема обычно появляется на 5 день от начала лихорадки, наиболее часто встречается диффузная макулопапулезная эритема. Возможно появление scarлатиноподобной сыпи, уртикарных элементов, различных типов эритемы. Высыпания обычно располагаются на туловище и конечностях со сгущением в области промежности, где рано начинается шелушение.

Характерны симптомы со стороны конечностей: в острую фазу отмечается эритема и индурация ладоней, подошв, отек кистей и стоп, а в подострую фазу — околоногтевое пластинчатое шелушение пальцев рук и ног, которое может распространяться на ладони и подошвы; кроме этого, через 1–2 месяца от начала лихорадки на ногтевых пластинках можно обнаружить глубокие поперечные бороздки (линии Боа), которые сохраняются до полной замены ногтевой пластинки.

Односторонняя шейная лимфоаденопатия является также характерным признаком болезни Kawasaki, чаще увеличивается несколько лимфатических узлов до 1,5 см и более, нагноения обычно не бывает, кожа над лимфоузлом не изменена.

Поражение сердечно-сосудистой системы: вовлечение в патологический процесс сердечно-сосудистой системы является характерным признаком болезни Kawasaki, основной причиной длительного течения болезни и летальных исходов. Чаще всего развивается миокардит (40–72% случаев), его степень тяжести не коррелирует с наличием или отсутствием риска развития аневризм коронарных артерий. Сократительная способность миокарда быстро восстанавливается после внутривенного введения γ -глобулина.

Аневризмы коронарных артерий возникают в 20–25% случаев без проведения адекватной терапии и толь-

ко в 4–5% — при введении иммуноглобулинов и приеме ацетилсалициловой кислоты. Согласно классификации Американской ассоциации сердца, аневризмы разделяют на три класса: малые (внутренний диаметр менее 5 мм), средние (внутренний диаметр от 5 до 8 мм), гигантские (внутренний диаметр более 8 мм).

К другим поражениям сердца при болезни Kawasaki относятся: пролапс митрального клапана, артериит без образования аневризм, выпотной перикардит, вальвулит. Возникновение пролапса клапанов (митрального или аортального) после купирования острой фазы болезни является следствием ишемии миокарда. Описаны случаи позднего развития вальвулитов, не связанных с ишемией.

Другие симптомы заболевания. В первую неделю лихорадки часто встречаются артриты и артралгии, вовлекается большое число суставов, но преимущественно мелких (межфаланговые и т. д.), а при развитии артритов после 10 дня болезни в процесс чаще вовлекаются крупные суставы (коленные, голеностопные). Часто (15–20%) в течение первых 2 недель болезни выявляются симптомы вовлечения в патологический процесс ЖКТ: рвота, диарея, болевой абдоминальный синдром, гепатомегалия, гипертрансфераземия, желтуха, острый некалькулезный холецистит.

Асептический менингит возникает обычно в течение первых 10 дней лихорадки в 10–53% случаев. Среди неврологических проявлений могут встречаться явления церебрального васкулита и пирамидные расстройства в виде нарушений походки, которые исчезают спонтанно в течение месяца без последствий. У пациентов можно наблюдать транзиторную потерю слуха.

Изменения лабораторных показателей при болезни Kawasaki неспецифичны, однако разработаны лабораторные диагностические признаки болезни Kawasaki, к ним относятся: лейкоцитоз более 15×10^9 /л с нейтрофилиезом и сдвигом влево, повышение уровня С-реактивного белка (СРБ) более 30 г/л, ускорение СОЭ более 40 мм/час, после 7-го дня лихорадки — тромбоцитоз более 450×10^6 /л; нормоцитарная нормохромная анемия; гипоальбуминемия (менее 30 г/л); стерильная лейкоцитурия, связанная с развитием уретрита; гипертрансфераземия, плеоцитоз с преобладанием мононуклеаров в цереброспинальной жидкости. Нормализация СОЭ и СРБ происходит к 6–10-й недели болезни, число тромбоцитов начинает нарастать на второй неделе болезни, достигает своего максимума на 3-й неделе и приходит к норме к 7–8-й неделе болезни.

Кроме этого, может выявляться дислипидемия со снижением уровня холестерина, липопротеинов высокой плотности и повышением концентрации триглицеридов и липопротеинов низкой плотности; гипербилирубинемия.

Диагноз и дифференциальный диагноз. Не существует методов диагностики, специфических для болезни Kawasaki. Диагноз основывается на обнаружении

у больного патогномичных диагностических и лабораторных критериев болезни Kawasaki: лихорадка в течение 5 дней или более в присутствии хотя бы четырех из пяти следующих критериев: двусторонний конъюнктивит, один или более признаков изменений слизистых оболочек респираторного тракта, включая фарингит, сухие, красные и потрескавшиеся губы, «земляничный» язык, один или более признаков со стороны кожи конечностей, включая периферический отек, десквамацию вокруг кожи ногтей, а также на ладонях и стопах, сыпь преимущественно на туловище, шейный лимфаденит; и отсутствии другой известной болезни подтвержденной этиологии, которая вызвала бы появление этих симптомов.

Следует подчеркнуть, что болезнь Kawasaki не является «диагнозом исключения», следовательно, при наличии симптомов, характерных для синдрома Kawasaki, этот диагноз должен быть установлен, и, самое главное, ребенок должен получить специфическую терапию.

Ведущие российские детские кардиоревматологи рекомендуют пациентам первых 6 месяцев жизни с лихорадкой длительностью 5–7 дней и неустановленным диагнозом проводить лабораторные исследования, а при наличии признаков системного воспаления — ЭхоКГ даже в отсутствие других клинических признаков болезни Kawasaki.

Дифференциальную диагностику болезни Kawasaki проводят с широким кругом инфекционных и неинфекционных заболеваний (табл. 1): стрептококковой инфекцией, иерсиниозом и псевдотуберкулезом, лептоспирозом, клещевым системным боррелиозом, пятнистой лихорадкой Скалистых гор и другими риккетсиозами, энтеровирусной инфекцией, корью, токсокарозом, синдромом Стивенса–Джонсона, ювенильным хроническим артритом, узелковым периартериитом, сепсисом различной этиологии; с болезнями, сопровождающимися ко-

ронаритами: синдром Рейтера, узелковый периартериит, гигантоклеточный артериит, артериит Такаюсу, болезнь Бехчета, синдром Когана, саркоидоз, сифилис, HLA-B27 ассоциированная спондилоартропатия, атеросклероз, сифилис, антифосфолипидный синдром, синдром Элерса–Данлоса, синдром Марфана, гемоцистинурия, болезнь Бюргера, фибромышечная дисплазия.

Осложнения. Кардиоваскулярные осложнения болезни Kawasaki: инфекционно-токсический шок, ишемическая болезнь сердца; инфаркт миокарда возникает в результате тромбоэмболической окклюзии аневризмы либо стеноза коронарной артерии; дилатационная кардиомиопатия; сердечная недостаточность; аневризма левого желудочка; стойкие нарушения ритма сердца и проводимости; внезапная сердечная смерть. Болезнь Kawasaki является основной причиной возникновения приобретенных пороков сердца в Японии и США.

Внесердечные осложнения: водянка желчного пузыря, острый холецистит; болезнь Пертеса; острая кишечная непроходимость; гангрена пальцев; аневризмы периферических артерий.

Лечение. Терапию болезни Kawasaki проводят в условиях стационара. Препаратами выбора являются внутривенные иммуноглобулины (ВИИГ) в сочетании с ацетилсалициловой кислотой. Внутривенный иммуноглобулин (γ-глобулин) должен быть введен пациенту в течение 12 часов после установления диагноза в дозе 2 г/кг массы тела однократно в течение 10–12 часов. Для получения максимального клинического эффекта введение ВИИГ должно быть произведено не позднее 10 дня болезни, эффективность препарата после 10-го дня болезни или при уже сформировавшихся аневризмах не установлена. При отсутствии эффекта от стартовой терапии иммуноглобулином введение препарата повторяют в той же дозе через 36–48 часов.

Ацетилсалициловая кислота оказывает противовоспалительное и противотромботическое действие, в ост-

Таблица 1. Нозологические формы, с которыми необходимо дифференцировать синдром Kawasaki у детей

Бактериальные инфекции	Вирусные инфекции	Паразитозы	Другие нозологические формы
Стрептококковая инфекция Иерсиниозы Лептоспироз Листериоз Бруцеллез Брюшной тиф Туляремия Риккетсиозы Менингококковая инфекция Клещевой боррелиоз	Энтеровирусная инфекция Краснуха Корь Герпесвирусные инфекции (вызванные вирусом Эпштейна–Барр, цитомегаловирусом, вирусами герпеса 6, 7 типа) Геморрагические лихорадки Парвовирусная инфекция B19	Трихинеллез Токсокароз Висцеральный лейшманиоз Малярия	Ревматизм Геморрагический васкулит Системные васкулиты другой этиологии Ювенильный хронический артрит Ювенильный идиопатический артрит Туберкулез Опухоли Лимфогранулематоз Лейкоз Гистиоцитозы Сепсис Крапивница Токсидермия Синдром Стивенса–Джонсона Синдром Лайелла Криопирин-ассоциированный синдром

рую фазу заболевания ее назначают в дозе 80–100 мг/кг массы тела в сутки в 4 приема, при отсутствии лихорадки в течение 72–120 часов дозу ацетилсалициловой кислоты снижают до 3–5 мг/кг массы тела в сутки (антиагрегантный эффект) в один прием. В последнее время многие исследователи говорят о необходимости снижения дозы ацетилсалициловой кислоты (30–50 мг/кг в сутки) в острую фазу болезни. Длительность назначения аспирина 6–8 недель, если не выявлено аневризм коронарных артерий, при их наличии прием аспирина продолжают длительно, в этом случае могут быть использованы нефракционированный или низкомолекулярный гепарин, варфарин, дипиридамол, клопидогрел.

В случае тромбоза коронарных артерий лечение проводят согласно алгоритму терапии острого коронарного синдрома у взрослых (стрептокиназа, урокиназа, фактор активации тканевого плазминогена, ингибитор гликопротеинов IIb/IIIa (абциксимаб)).

Эффективность глюкокортикоидов при болезни Kawasaki дискутабельна. Отдельные авторы считают, что их эффективность не доказана при данном заболевании, а применение кортикостероидов в острую фазу болезни полностью противопоказано, так как они способствуют развитию аневризм и возникновению тромбозов. Другие исследователи сообщают об их эффективности у пациентов, клинически и лабораторно «не отвечающих» на повторное введение ВВИГ, и рекомендуют в этих случаях проводить пульс-терапию метилпреднизолоном в дозе 30 мг/кг массы тела в течение 2–3 часов 1 раз в сутки в течение 2–3 дней. Доказана эффективность блокаторов ФНО- α (инфликсимаба) как препаратов стартовой терапии в сочетании с иммуноглобулинами, так и в виде монотерапии, имеются сообщения об эффективности блокаторов ФНО- α при резистентных к традиционной терапии формах болезни Kawasaki.

Отдельные авторы рекомендуют включать в комплекс терапии трентал в дозе 10–15 мг/кг/сут, так как он блокирует выработку ФНО- α , курс трентала обычно составляет 1,5 мес. Хорошие клинические результаты получены при проведении плазмафереза.

Значительная степень окклюзии левой главной коронарной артерии, либо более чем одной из коронарных ветвей; значительная окклюзия проксимального участка левой передней нисходящей артерии и плохой коллатеральный кровоток являются показаниями к проведению аорто-коронарного шунтирования.

Прогноз. Прогноз для жизни и здоровья благоприятный. Летальность при болезни Kawasaki без применения внутривенных иммуноглобулинов составляла 2–3%, а при их применении летальность снизилась до 0,02–0,1%.

Установлено, что вторая и третья недели заболевания являются наиболее опасными ввиду самого высокого риска коронарного тромбоза, инфаркта миокарда и летального исхода.

Профилактика и мероприятия в очаге. Не разработаны.

Правила выписки пациентов. Пациенты могут быть выписаны из стационара не ранее 21-го дня при условии проведения адекватной терапии и отсутствии осложнений. Во всех остальных случаях длительность госпитализации определяется индивидуально.

Диспансеризация. Пациенты, перенесшие болезнь Kawasaki, нуждаются в диспансерном наблюдении педиатра и кардиоревматолога. Выполняют ЭКГ, эхокардиографию в динамике, при необходимости проводят холтеровское мониторирование ЭКГ, коронарографию.

Таким образом, детские инфекционисты и педиатры в своей профессиональной деятельности сталкиваются с больными с болезнью Kawasaki, но, к сожалению, часто не устанавливают правильный диагноз. Проведение рациональной терапии и своевременного обследования ССС требует совместной работы с кардиоревматологами.

Литература

1. Баранова И. П., Лесина О. Н., Кокурочникова Г. Н. и соавт. Случаи болезни Kawasaki у детей: сложности диагностики, особенности лечения // *Детские инфекции*, 2012; 2: 70–73.
2. Белозеров Ю. М., Брегель Л. В., Субботин В. М. Болезнь Kawasaki — особенности клинических симптомов и кардиальных проявлений у детей российской популяции // *Педиатрия*, 2010; 3: 31–37.
3. Брегель А. В., Субботин В. М., Солдатова Т. А. и соавт. Эпидемиологические особенности болезни Kawasaki в Иркутской области: результаты многолетних наблюдений // *Педиатрия*, 2011; 5: 49–53.
4. Гедике Г., Хайнкин Б., Хотам П. Д. Болезнь Kawasaki — новые данные // *Вопросы современной педиатрии*, 2010; 1: 104–115.
5. Денисова Л. Б., Григорьева Н. М., Вишнякова М. В. и соавт. Болезнь Kawasaki у взрослого европейца // *Клиническая медицина*, 2009; 7: 63–66.
6. Иванов А. С., Абугов С. А., Тарасова А. А., Лыскина Г. А. и соавт. Результаты динамического наблюдения пациентов с синдромом Kawasaki по данным трансторакальной эхокардиографии, мультиспиральной компьютерной томографии и коронарной ангиографии // *Ультразвуковая и функциональная диагностика*, 2011; 1: 47–55.
7. Иванов А. С., Балоян Г. М., Абугов С. А. и соавт. Успешное оперативное лечение стеноза передней нисходящей коронарной артерии у ребенка 4 лет с синдромом Kawasaki // *Педиатрия*, 2009; 1: 142–145.
8. Лукушкина Е. Ф., Костарева Т. Ю., Афраймович М. Г. и соавт. Клинический случай диагностики болезни Kawasaki у детей // *Медицинский альманах*, 2010; 2: 144–146.
9. Лыскина Г. А. Клиническая картина, лечение и прогноз слизисто-кожного лимфодулярного синдрома (Kawasaki) // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*, 2007; 2: 31–35.
10. Лыскина Г. А. Системные васкулиты у детей // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*, 2003; 2: 10–14.
11. Лыскина Г. А., Виноградова О. И., Ширинская О. Г. и соавт. Клиника диагностики и лечение болезни Kawasaki // *Клинические рекомендации*. М., 2012: 62.
12. Лыскина Г. А., Подчерняева Н. С. Принципы терапии системных заболеваний соединительной ткани у детей // *Педиатрия*, 2003; 3: 96–104.
13. Лыскина Г. А., Ширинская О. Г. Клиническая картина, диагностика и лечение синдрома Kawasaki: известные факторы и нерешенные проблемы // *Вопросы современной педиатрии*. 2013; 12 (1): 63–73.
14. Лыскина Г. А., Ширинская О. Г. Слизисто-кожный лимфодулярный синдром (синдром Kawasaki). Диагностика и лечение. М.: Видар-М. 2008: 144.

15. Лыскина Г. А., Ширинская О. Г., Гагарина Н. В. Проблемы развития и исходов аневризм коронарных артерий у детей с синдромом Кавасаки // Педиатрия. 2012; 3: 104–109.
16. Лыскина Г. А., Ширинская О. Г., Шпитонкова О. В. и соавт. Случай синдрома Кавасаки с образованием гигантских аневризм коронарных артерий // Вопросы практической педиатрии. 2012; 3: 72–76.
17. Мутина А. Н. Клиническая и прогностическая роль изменений ЭКГ при болезни Кавасаки у детей: Автореферат диссертации канд. мед. н. Томск. 2011: 21.
18. Мутина А. Н., Брегель Л. В., Субботин В. М. Патологические изменения электрокардиограммы у детей в хронической стадии слизисто-кожно-лимфо-железистого синдрома // Сибирский медицинский журнал. 2008; 6: 43–45.
19. Петрова М. С., Бочкарева С. С., Новикова Л. И., Лютов А. Г., Алешкин В. А., Абрамова Е. Н., Рахалина А. А. Опыт клинического наблюдения и лечения больных синдромом Кавасаки // Инфекционные болезни. 2012; 1: 84–87.
20. Руководство по детской ревматологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011.
21. Судакова Н. М., Гревцева Н. И., Еремеева Н. В., Юшинова А. Л. Трудности диагностики болезни Кавасаки // Педиатрия. 2009; 3: 140–143.
22. Тарасова А. А., Лыскина Г. А., Пильх А. Д., Ширинская О. Г., Леонтьева А. А. Трансторакальная эхокардиография в диагностике аневризм коронарных артерий у детей с синдромом Кавасаки // Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2010; 1: 43–52.
23. Толстикова Т. В., Брегель Л. В., Киклевич В. Т., Субботин В. М. Коронариты у детей // Сибирский медицинский журнал. 2009; 2: 110–112.
24. Ширинская О. Г., Лыскина Г. А., Тарасова А. А., Гагарина Н. В., Абузов С. А., Иванов А. С., Пильх А. Д., Леонтьева А. А. Результаты динамического наблюдения больных с синдромом Кавасаки по данным трансторакальной эхокардиографии, мультиспиральной компьютерной томографии и коронарной ангиографии // Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2011; 1: 47–55.
25. Ширинская О. Г. Поражение коронарных артерий у детей с синдромом Кавасаки в остром периоде и при динамическом наблюдении: Автореферат дисс. ... канд. мед. н. М., 2011: 27.
26. Ширинская О. Г., Есян И. С. Поражение сердца при синдроме Кавасаки // Педиатрия. 2008; 3: 145–146.
27. Ширинская О. Г., Тарасова А. А., Лыскина Г. А. Ультразвуковое исследование коронарных артерий у детей // Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2008; 4: 76–88.
28. Ширинская О. Г., Тарасова А. А., Лыскина Г. А., Пильх А. Д., Леонтьева А. А. Трансторакальная эхокардиография в диагностике аневризм коронарных артерий у детей с синдромом Кавасаки // Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2010; 1: 43–52.
29. Athappan G., Gale S., Ponniah T. Corticosteroid therapy for primary treatment of Kawasaki disease — weight of evidence: a meta-analysis and systematic review of the literature // Cardiovasc. J. Afr. 2009 Jul-Aug; 20 (4): 233–236.
30. Baker A. L., Lu M., Minich L. L. et al. Associated symptoms in the ten days before diagnosis of Kawasaki disease // J. Pediatr. 2009; 154: 592–595 e2.
31. Burns J. C., Best B. M., Mejias A. et al. Infliximab treatment of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease // J. Pediatr. 2008; 153: 833–838.
32. Burns J. C., Glode M. P. Kawasaki syndrome // Lancet. 2004; 364: 533–544.
33. Burns J. C., Mason W. H., Hauger S. B. Infliximab treatment for refractory Kawasaki syndrome // J. Pediatr. 2005; 146: 662–667.
34. Burns J. C., Kushner H. I., Bastian J. F., Shike H., Shimizu C., Matsubara T., Turner C. L. Kawasaki disease: A brief history // Pediatrics. 2000 Aug; 106 (2): E27.
35. Choi J. Y., Park S. Y., Choi K. H., Park Y. H., Lee Y. H. Clinical characteristics of Kawasaki disease with sterile pyuria // Korean J. Pediatr. 2013 Jan; 56 (1): 13–18.
36. Dominguez S. R., Anderson M. S., El-Adawy M., Glodé M. P. Preventing coronary artery abnormalities: a need for earlier diagnosis and treatment of kawasaki disease // Pediatr. Infect. Dis J. 2012 Dec; 31 (12): 1217–1220.
37. Dominguez S. R., Anderson M. S. Advances in the treatment of Kawasaki disease // Curr. Opin. Pediatr. 2013 Feb; 25 (1): 103–109.
38. Furukawa T., Kishiro M., Akimoto K. et al. Effects of steroid pulse therapy on immunoglobulin-resistant Kawasaki disease // Arch. Dis. Child. 2008; 93: 142–146.
39. Guidelines for diagnosis and management of cardiovascular sequelae in Kawasaki disease // Pediatr. Int. 2005; 47: 711–732.
40. Guidelines for diagnosis and management of cardiovascular sequelae in Kawasaki disease (JCS 2008)— digest version // Circ. J. 2010; 74: 1989–2020.
41. Imai Y., Sunagawa K., Ayusawa M. et al. A fatal case of ruptured giant coronary artery aneurysm // Eur. J. Pediatr. 2006; 165: 130–133.
42. Kafetzis D. A., Maltezou H. C., Constantopoulou I. et al. Lack of association between Kawasaki syndrome and infection with Rickettsia conorii, Rickettsia typhi, Coxiella burnetii or Ehrlichia phagocytophila group // Pediatr. Infect. Dis. J. 2001; 20: 703–706.
43. Korematsu S., Uchiyama S., Miyahara H. et al. The characterization of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with Kawasaki disease // Pediatr. Infect. Dis. J. 2007; 26: 750–753.
44. Kushner H. I., Bastian J. F., Turner C. L., Burns J. C. The two emergencies of Kawasaki syndrome and the implications for the developing world // Pediatr. Infect. Dis. J. 2008 May; 27 (5): 377–383.
45. Luca N. J., Yeung R. S. Epidemiology and management of Kawasaki disease. Drugs. 2012 May 28; 72 (8): 1029–1038.
46. Maconochie I. Kawasaki disease. Archives of Disease in Childhood Education and Practice Edition. 2004: eр3.
47. McCrindle B. W., Li J. S., Minich L. L. et al. Coronary artery involvement in children with Kawasaki disease: risk factors from analysis of serial normalized measurements. Circulation 2007; 116: 174–179.
48. Meissner H. C., Leung D. Y. Superantigens, conventional antigens and the etiology of Kawasaki syndrome // Pediatr. Infect. Dis. J. 2000; 19: 91–94.
49. Nakamura Y., Yashiro M., Uehara R. et al. Epidemiologic features of Kawasaki disease in Japan: results of the 2007–2008 nationwide survey // J. Epidemiol. 2010; 20: 302–307.
50. Navarro R. P., Ballow M., Fenrick B., Pezalla E. J. Considerations for the optimal use of immunoglobulin // Am. J. Manag. Care. 2012 Jun; 18 (4 Suppl): S67–78.
51. Newburger J. W., Takahashi M., Gerber M. A., et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: a statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association // Pediatrics 2004; 114: 1708–1733.
52. Newburger J. W., Fulton D. R. Kawasaki disease // Curr. Opin. Pediatr. 2004 Oct; 16 (5): 508–514.
53. Oates-Whitehead R. M., Baumer J. H., Haines L. et al. Intravenous immunoglobulin for the treatment of Kawasaki disease in children // Cochrane Database Syst. Rev. 2003: CD004000.
54. Rowley A. H., Baker S. C., Shulman S. T. et al. Ultrastructural, immunofluorescence, and RNA evidence support the hypothesis of a «new» virus associated with Kawasaki disease // J. Infect. Dis. 2011; 203: 1021–1030.
55. Shike H., Kanegaye J. T., Best B. M. et al. Pyuria Associated With Acute Kawasaki Disease and Fever From Other Causes // Pediatr. Infect. Dis. J. 2009.
56. Uehara R., Belay E. D. Epidemiology of Kawasaki disease in Asia, Europe, and the United States // LJ Epidemiol. 2012; 22 (2): 79–85.
57. Weng K. P., Ou S. F., Lin C. C., Hsieh K. S. Recent advances in the treatment of Kawasaki disease // J. Chin. Med. Assoc. 2011 Nov; 74 (11): 481–484.
58. Yellen E. S., Gauvreau K., Takahashi M. et al. Performance of 2004 American Heart Association recommendations for treatment of Kawasaki disease // Pediatrics. 2010; 125: 234–241.
59. Zhang X., Zhang Z., Liu S., Sun J. Epidemiologic survey of Kawasaki disease in Jilin from 1999 through 2008 // Pediatr. Cardiol. 2012 Feb; 33 (2): 272–279.

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ АНТИКОАГУЛЯНТОВ НА РЕЗУЛЬТАТЫ КОАГУЛОГРАММЫ

Хелен Мани, д. фил.; Карола Вагнер, д. фил.; проф. Эдельгард Линдхоф-Ласт, канд. мед. н.

Антикоагулянты применяют для профилактики и лечения тромбоэмболических нарушений. Пациентам, которым проводят такие процедуры, как полная замена тазобедренного сустава, назначают лекарственные средства для профилактики тромбоза, как правило, антагонисты витамина К, такие как варфарин или нефракционный или низкомолекулярный гепарин. Существует много подтверждений недостатков применения таких средств. Варфарин взаимодействует со многими продуктами питания и другими лекарственными средствами, назначение дозировок препарата требует индивидуального подхода, а начало его действия отсрочено. Нефракционные гепарины и низкомолекулярные гепарины (НМГ), которые требуют парентерального введения, повышают риск возникновения гепарин-индуцированной тромбоцитопении, остеопороза и кровотечения. В связи с этим применение этих средств является проблематичным и неудобным для врачей и пациентов.

Ввиду побочных эффектов традиционных антикоагулянтов проводятся исследования новых лекарственных средств с такими преимуществами, как пероральное применение, бо-

лее предсказуемая ответная реакция, большая специфичность, независимая от действия антитромбина, а также отсутствие необходимости регулярного наблюдения пациентов. Как показано на рисунке 1, на котором продемонстрированы разные фазы гемостаза, поиски новых антикоагулянтов сфокусировались в основном на использовании специальных молекул для прямого ингибирования коагуляционных факторов внутри каскада коагуляции, таких как тромбин или активированный фактор X (ФХа).

Ривароксабан (Rivaroxaban) и дабигатран (dabigatran) относятся к новому поколению антикоагулянтов для перорального применения, которые используются в клинической практике более двух лет. Основное показание к применению этих средств — предупреждение тромбоэмболических явлений после плановой операции по замене тазобедренного или коленного сустава и для профилактики инсульта и системной эмболии у пациентов с мерцательной аритмией.

Анализ системы гемостаза, как правило, проводится после применения антикоагулянтов в клинике, в рамках обычных лабораторных анализов, проводимых после хирургического



Рис. 1. Цели антикоагулянтов

вмешательства. В ходе нескольких исследований в условиях *ex vivo* и *in vitro* изучали дозозависимый эффект новых антикоагулянтов у пациентов и здоровых участников исследования.

В этой статье приводится краткое описание фармакологических свойств новых антикоагулянтов и их влияния на результаты коагуляционных тестов.

Новые антикоагулянты

Прямые ингибиторы тромбина

Благодаря своей роли в процессе коагуляции, тромбин является одной из главных целей в разработке антикоагулянтов прямого действия. В отличие от гепаринов, прямые ингибиторы тромбина (ПИТы) — это маленькие молекулы, которые ингибируют тромбин напрямую, не требуя наличия ко-фактора. ПИТ приводит к специфическому связыванию свободного и фибрин-связанного тромбина, таким образом предупреждая образование фибрина, тромбин-ассоциированную активацию FV, FVIII, FXI и FXIII, а также тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Поскольку химическая структура этих веществ отличается от структуры гепарина, ПИТы не взаимодействуют с антителами к гепарин-индуцированной тромбоцитопении, тип II (ГИТ-II).

В течение нескольких лет применялись три ПИТа для парентерального введения: лепирудин (*lepirudin (Refludan®)*), бивалирудин (*bivalirudin (Angiox®)*) и аргатробан (*argatroban (Novastan®)*).

Первый ПИТ для перорального применения — ксимелатран (*ximelagatran (Exanta®)*) — был снят с производства в феврале 2006 г., через полтора года после утверждения, из-за побочных эффектов.

Дабигатран (Dabigatran (Pradaxa®))

В марте 2008 г. дабигатран (*dabigatran*) был одобрен ЕМЕА (Европейским агентством по оценке лекарственных препаратов) как препарат для перорального применения, являющийся альтернативой гепарина после операции по замене тазобедренного и коленного суставов. В августе 2011 г. дабигатран был разрешен уполномоченными организациями Европейского Союза для использования с целью профилактики инсульта и системной эмболии у пациентов с мерцательной аритмией, после одобрения его применения по этому показанию в США в октябре 2010 г.

Дабигатран этексилат является предшественником дабигатрана, который избирательно и обратимо ингибирует как свободный, так и связанный со сгустком тромбин путем связывания к активному участку молекулы тромбина. Рекомендуемая доза дабигатрана этексилата составляет 220 мг один раз в день, кроме пациентов преклонного возраста (75 лет или старше) или пациентов с умеренной почечной недостаточностью, в этом случае рекомендуемая доза составляет 150 мг в день. Его стабильные и воспроизводимые фармакокинетические свойства являются преимуществом по сравнению с традиционными антикоагулянтами для перорального применения; его можно назначать с фиксированной

дозировкой, и он практически не взаимодействует с пищевыми продуктами и лекарственными средствами. Время достижения максимальной концентрации в плазме составляет 1,25–2,5 часа, а период полувыведения — около 12–14 часов. Лекарственное средство не метаболизируется, не индуцируется и не ингибируется лекарственно-метаболизирующими ферментами цитохрома P450. Специфических веществ обратного действия для дабигатрана не существует.

Непрямые и прямые ингибиторы фактора Ха

Фактор Ха является второй основной целью разработки антикоагулянтов прямого действия. Как и тромбин, фактор Ха является фактором коагуляции, который активируется на месте конвергенции внутренних и внешних путей в системе свертывания крови.

Непрямые ингибиторы фактора Ха, такие как фондапаринукс, проявляют свою антитромботическую активность путем связывания с антитромбином; поэтому их эффективность зависит от уровня циркулирующего антитромбина. Это вещества для парентерального введения и их не следует применять перорально.

Ривароксабан является первым прямым ингибитором фактора Ха для перорального применения. Он селективно ингибирует активность свободного и связанного со сгустком фактора Ха и разрешен для перорального применения в качестве альтернативы гепарина после операции по замене тазобедренного и коленного суставов с октября 2008 г. Ривароксабан был впервые одобрен для использования в США в ноябре 2011 г. для профилактики инсульта у пациентов с мерцательной аритмией. Аписабан, более новый ингибитор фактора Ха для перорального применения, был одобрен для использования после операции по замене тазобедренного и коленного суставов в Европе в мае 2011 г. К другим прямым ингибиторам фактора Ха для перорального применения, находящимся в разработке, относятся эдоксабан или дарексабан, которые проходят фазу III исследования, и бетриксабан, который успешно прошел фазу II клинических испытаний.

Данапароид (Органан)

Непрямой ингибитор фактора Ха данапароид натрия является смесью частично деполимеризованных гликозаминогликанов. Связанный с антитромбином данапароид катализирует инактивацию фактора Ха. Также происходит ингибирование тромбина, связанное с сопутствующими факторами II антитромбина и гепарина. Однако соотношение активности анти-Ха к анти-IIa больше, чем 22:1. Вещество применяют в клинической практике для профилактики тромбоза и, из-за низкой перекрестной реактивности с фактором 4 гепарин-тромбоцит, оно также подходит для лечения иммунной ГИТ-II.

Фондапаринукс (Arixtra®)

Этот синтетический пентасахарид, непрямой ингибитор фактора Ха, взаимодействует путем специфического связывания с антитромбином; он не оказывает влияния на тромбин или неспецифическое соединение протеинов плазмы. После подкожного введения биодоступность вещества составляет

почти 100%. Лекарственное средство выводится через почки, период полувыведения составляет приблизительно 17 часов. Исследования *in vitro* подтверждают отсутствие перекрестной реактивности с антителами к ГИТ.

Идрапаринукс

Из-за необратимой связи с антитромбином этот сульфированный пентасахарид характеризуется длительным периодом полувыведения, который составляет приблизительно 80 часов. Это очень удобно для пациентов, поскольку достаточно одной подкожной инъекции в неделю. Однако для идрапаринукса не существует антидота. Биотинилированная форма этого лекарственного средства, которая сейчас проходит клинические испытания, может быть инактивирована с помощью авидина (тетраметрический биотин-связывающий белок).

Ривароксабан (Xarelto®)

Ривароксабан обладает селективным и обратимым действием. Период достижения максимальной концентрации в плазме составляет от 30 минут до 3 часов, а период полувыведения — 3–9 часов. Ривароксабан обеспечивает ингибирование фактора Ха, зависимое от концентрации, с высоким потенциалом и селективностью, и дозозависимое ингибирование тканевого фактора Ха. Он метаболизируется с помощью CYP3A4 в системе CYP450. Однако 33% активного вещества выводится в неизменном виде в соотношении 70% через почки и 30% через кишечник. Поэтому ривароксабан взаимодействует с системой CYP450, в частности, с CYP3A4. Влияние таких факторов как избыточная масса тела, возраст или пол на фармакологические свойства лекарственного средства не наблюдалось.

Ривароксабан связывается не только со свободным фактором Ха, но и с фактором Ха, связанным с протромбиновым комплексом.

Апиксабан (Eliquis®)

Апиксабан является селективным, обратимым, прямым ингибитором фактора Ха для перорального применения. Время достижения максимальной концентрации в плазме составляет от 30 минут до 2 часов, а период полувыведения — 8–15 часов. Апиксабан проявляет умеренную селективность по отношению к фактору Ха, связанному со сгустком, против свободного фактора Ха и также ингибирует образование тромбина. Апиксабан абсорбируется в желудочно-кишечном тракте. Биодоступность вещества составляет 50%. В печени вещество окисляется до производного фенола, при этом метаболизм с участием цитохрома P450 играет незначительную роль. Выведение лекарственного средства осуществляется в основном через желчь, а также через почки (25%). Рекомендуемая доза — 2,5 мг перорально два раза в день.

Фармакологические свойства

В таблице 1 приведен краткий обзор фармакологических свойств этих новых веществ, которые отличаются в основном биодоступностью и метаболизмом.

Преимущества и проблемы

Новые коагулянты принято считать более удобными и простыми в использовании, чем обычные препараты, так как мониторинг и регулировка дозы не требуются.

Более важное клиническое преимущество новых веществ состоит в том, что их связывание с коагуляционным фактором является обратимым, поэтому они обеспечивают лучший контроль и несут гораздо меньший риск кровотечения по сравнению с необратимо действующими ингибиторами (например, гирудин).

Значительный минус их применения состоит в том, что антидотов, помогающих быстро отменить действие нового лекарства там, где это требуется, не существует. Другая проблема — способ действия данных новых антикоагулянтов: он может изменить или неверно отобразить результаты коагулограммы. Медицинским работникам необходимо учитывать возможное воздействие антикоагулянтов на разные типы анализов коагуляционной активности, чтобы избежать неправильной интерпретации результатов.

Тесты на коагуляцию

Клоттинговые методы

Клоттинговые тесты до сих пор являются наиболее популярными из всех форм анализов в лабораториях гемостаза. Во время анализа измеряется время между добавлением реагента тромбoplastина и образованием фибринового сгустка. Увеличивающаяся вязкость и мутность образца позволяют зафиксировать образование сгустка с помощью определения точки завершения процесса механически или оптически.

Хромогенные методы

Появление синтетических хромогенных субстратов стало поворотным моментом в изучении индивидуальных ингибиторов коагуляции. Хромогенный анализ позволяет напрямую увидеть активность субстрата.

Одним из традиционных методов анализов хромогенных субстратов является определение ингибирующей активности антикоагулянтов на фактор Ха. В ходе данного анализа активация фактора Ха образца вызывается одним из ферментов, активирующих Ха-фактор. Активированный фактор напрямую связан с хромогенным субстратом.

Предварительные исследования показывают, что хромогенные тесты на анти-фактор Ха являются, при необходимости, потенциально лучшим типом тестов для измерения концентрации ривароксабана в крови.

Протромбиновый индекс

Протромбиновый индекс (протромбиновое время — ПВ) представляет собой скрининговый тест, отражающий функциональность внешнего пути свертывания. Он используется для получения представления о факторах VII, X, V, тромбине и фибриногене.

Активированное частичное тромбoplastиновое время

В отличие от теста на ПВ, активированное частичное тромбoplastиновое время (АЧТВ) представляет собой скрининг

Таблица 1. Обзор одобренных новых антикоагулянтов (ЕС; Окт. 2011)

Антикоагуляция	Вещество (лекарственное средство)	Применение	Период полувыведения (время до достижения макс. концентрации)	Выведение	Одобрённые сферы применения	Последующее наблюдение
	Дабигатран (Pradaxa®)	Перорально, дважды в день	14–17 ч (2–4 ч)	Почки	Профилактика ВТЭ при плановой операции по замене тазобедренного или коленного сустава. Профилактика инсульта при мерцательной аритмии	Не требуется Опции: тромбиновое время с разведением, экариновое время свертывания (ЭВС), количественный анализ анти-ФIIa (требует калибровки с дабигатраном)
Прямые ингибиторы тромбина	Аргатробан (Argatra®, Novastan®)	Внутривенно	25 мин	Печень	Профилактика, лечение ГИТ-II	Обязательно Показатель АЧТВ: в 1,5–3,0 раза Хромогенный тест ЭВС, количественный анализ анти-FIIa (требует калибровки с аргатробаном)
	Бивалрудин (Angiox®)		25 мин	Почки	Острая коронарная недостаточность (ОКН) Раннее запланированное вмешательство Чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ)	Рекомендовано ABC Цель: ABC (активированное время свертывания) >115 сек
Прямые ингибиторы FXa	Ривароксабан (Xarelto®)	Перорально, один раз в день	7–11 ч (2–4 ч)	Почки и печень	Профилактика ВТЭ при плановой операции по замене тазобедренного или коленного сустава. США: профилактика инсульта при мерцательной аритмии	Не требуется Опции: количественный анализ анти-FXa (требует калибровки с ривароксабаном)
	Апиксабан (Eliquis)	Перорально, дважды в день	8–15 ч (0,5–2 ч)	Почки и желчный пузырь	Профилактика ВТЭ при плановой операции по замене тазобедренного или коленного сустава	Не требуется Опции: количественный анализ анти-FXa (требует калибровки с апиксабаном)
Непрямые ингибиторы	Фондапаринукс (Arixtra®)	Внутривенно; подкожно, раз в день	17 ч (25 мин)	Почки	Лечение и профилактика ВТЭ ОКН (без вмешательства)	Не требуется Опции: количественный анализ анти-FXa (требует калибровки с фондапаринуксом)
FXa (требуют антитромбин)	Данапароид (Orgaran®)	Внутривенно; подкожно, дважды в день	7–8 ч (4–5 ч)	Почки	Лечение и профилактика ВТЭ при ГИТ-II	Рекомендуется для пациентов с почечной недостаточностью и весом >90 кг количественный анализ анти-FXa (требует калибровки с данапароидом)

внутренней системы и её факторов: кининоген, прекалликреин, XII, XI, IX, VIII, X, V и тромбин. В ходе анализа во время фазы предварительной инкубации/активации антитромбиновые/гепариновые комплексы могут инактивировать тромбин и его положительные реакции.

Тромбиновое время

Тромбиновое время (ТВ) — это клоттинговый скринговый тест на полимеризацию фибриногена. Он выполняется путем добавления низких концентраций тромбина в плазму. Это приводит к образованию фибрина. Анализ ТВ является функ-

циональным тестом на концентрацию фибриногена и образование фибрина.

Фибриноген (по Клауссу)

Определение фибриногена является еще одним рутинным параметром гемостаза. Этот часто используемый метод — метод Клаусса — основан на добавлении избыточного количества тромбина в плазму.

Расчетный фибриноген

Общее увеличение мутности во время анализа на протромбиновое время (ПВ) прямо пропорционально концентрациям фибриногена. Следовательно, фибриноген, полученный во время анализа ПВ, широко используется в качестве альтернативного метода измерения фибриногена.

Антитромбин

Антитромбин определяется измерением тормозящего эффекта либо на тромбин либо на FXa в роли целевого фермента.

Протеин С

Коагулометрический анализ протеина С основан на реакции АЧТВ, в которой активированный протеин С инактивирует усилители FVa и FVIIIa, продлевая время коагуляции увеличенным содержанием уровня протеина С. Хромогенный тест на протеин С позволяет напрямую определить активность ферментов.

Протеин S

Коагулометрический тест на протеин S на основе dRVVT (время разбавленного яда гадюки Рассела), зафиксированное время коагуляции пропорционально уровню протеина S.

Волчаночный антикоагулянт (ВА)

Для определения волчаночного антикоагулянта ВА измеряется отношение между показателем dRVVT (время разбавленного яда гадюки Рассела) с низким содержанием фосфолипидов (скрининг на ВА) и dRVVT с высоким содержанием фосфолипидов (подтверждение ВА).

Глобальный анализ ProC и резистентность к активированному протеину С (APCR)

Глобальный тест на ProC® — это скрининговый тест на протеин С на основе АЧТВ, определяющий соотношение разбавленного АЧТВ при активации протеина С к отсутствию активации протеина С.

Анализ ProC AcR — это простой и точный анализ для определения APCR/фактора V Лейдена, который основан на использовании dRVVT при наличии или отсутствии активатора протеина С.

Влияние новых антикоагулянтов на параметры коагулограммы

Стабильная и воспроизводимая фармакокинетика новых пероральных антикоагулянтов дает им преимущество перед обыкновенными реагентами, позволяя принимать их в назна-

ченных дозах и отменяя необходимость в лабораторном наблюдении за параметрами свертывания. Определение концентраций пероральных антикоагулянтов, таких как ривароксабан или дабигатран, может помочь только в некоторых случаях, например — при передозировке, у пациентов с геморрагическими или тромбоемболическими осложнениями во время лечения, у пациентов с ухудшающейся работой почек, или же у пациентов, требующих немедленного оперативного вмешательства.

Несмотря на это, прием новых антикоагулянтов (например, прямых ингибиторов тромбина или FXa) может стать причиной существенного увеличения реакций на образование сгустков, что, в свою очередь, приводит к изменению и потенциальной ошибочности результатов стандартных анализов на свертываемость.

Имели место несколько лабораторных случаев, когда дабигатран существенно менял результаты стандартных параметров коагулограммы. Связи *ex vivo* между ривароксабаном и общими параметрами коагулограммы в различные промежутки времени после приема препарата также были изучены на пациентах. В больничных условиях такие изменения отразились на результатах коагулограммы у послеоперационных пациентов, что вызвало беспокойство по поводу возможных кровотечений у них. Из-за возможности изменения и ошибочности результатов докторам следует точно интерпретировать параметры коагулограммы у пациентов, принимающих, к примеру, ривароксабан или дабигатран. Необходимо иметь полные знания о действии данных лекарств на рутинные параметры свертываемости.

Изменение результатов измерения ПВ выражается в увеличенных показателях МНО или ПВ (в секундах) под влиянием тромбиновых или FXa в зависимости от их концентрации. И наоборот, не прямые ингибиторы фактора Ха, такие как низкомолекулярные гепарины, которые действуют через антитромбиновые/гепариновые комплексы, не влияют на результаты ПВ. Ривароксабан и дабигатран увеличивают ПВ, причем чувствительность зависит от применяемого реагента. Однако ПВ не дает достаточную чувствительность для определения клинически значимых изменений в концентрации препарата.

Тест на АЧТВ более чувствителен к гепарину или гирудину, а пролонгация АЧТВ возникает при увеличении прямых ингибиторов фактора Ха или тромбина. На примере здоровых доноров было выявлено, что АЧТВ и модифицированное ПВ были дозозависимо удлиненными и коррелировали с концентрациями апиксабана в плазме.

Ингибиторы фактора Ха не влияют на тест ТВ, но ингибиторы тромбина (как прямые, так и не прямые) ведут к увеличению ТВ. Поэтому измененное разведенное ТВ и время свертывания экарина (ЕСТ) являются крайне чувствительными тестами для дабигатрана.

Ингибиторы фактора Ха не влияют на результаты измерения фибриногена по Клауссу, так как этот метод основан на добавлении избытка тромбина в плазму. Однако прямые ингибиторы тромбина могут привести к ошибочно заниженным концентрациям фибриногена в некоторых тестах. Влия-

Таблица 2. Влияние антикоагулянтов на рутинные коагуляционные тесты

	Прямые ингибиторы тромбина	Прямые ингибиторы FXa	Непрямые ингибиторы FXa
ПВ в сек, МНО 1,2	↑	↑	Нет
АЧТВ 2	↑	↑	Нет
ТВ	↑↑	Нет	Нет
Фибриноген (Клаусс)	Нет/↓	Нет	Нет
Мультифибрин U	↓↓	Нет	Нет
Расчетный фибриноген	Нет/↓	Нет/↓	Нет
D-димеры	Нет	Нет	Нет

ние антикоагулянтов в тесте на фибриноген на основе полученного из ПВ расчетного фибриногена является альтернативным методом для измерения фибриногена и аналогично влиянию на измерение ПВ.

В таблице 2 приведен обзор влияний различных классов антикоагулянтов на свойства системы свертывания, основанных на исследованиях *in vitro*. В целом все тесты, на которые было оказано влияние, изменяются дозозависимым образом, и лечебные дозы имеют более сильное влияние, чем профилактические.

Скрининг на тромбофилию показан для пациентов с тромбозом глубоких вен или замещением плазмы. Однако во многих случаях пациенты уже принимают антикоагулянты перед взятием пробы на тромбофилию. В силу того, что обычные и новые антикоагулянты направлены на ключевые ферменты системы свертывания — тромбин или FXa, — любое лечение антикоагулянтами оказывает влияние на некоторые тесты на тромбофилию.

Антитромбин можно определить путем изменения ингибиторного эффекта либо на тромбин, либо на FXa для ключевых ферментов. В зависимости от того, какой из ферментов

является мишенью, присутствие ингибиторов тромбина или FXa будет результировать в виде ложно-завышенных уровней антитромбина.

Наличие прямых ингибиторов тромбина или FXa приводит к ложно-завышенному уровню белков протеин С или S в коагуляционных тестах. В качестве варианта, протеин С может быть измерен напрямую после активации в хромогенном тесте, который не подвержен влиянию любого присутствующего антикоагулянта. Тесты на скрининг и подтверждение волчаночных антикоагулянтов показывают увеличение времени при наличии прямых ингибиторов тромбина или FXa; влияние на данную зависимость предсказать невозможно. При проведении тестов «ProC Global» и на резистентность к активированному протеину С (APCR) время свертывания обычно увеличивается из-за присутствия прямых ингибиторов тромбина или FXa, поэтому влияние на соотношение также является непредсказуемым.

1. Если ПВ используется для мониторинга, результаты должны выдаваться в секундах, т. к. система МНО не работает для новых коагулянтов.

Таблица 3. Влияние антикоагулянтов на анализы на тромбофилию

		Прямые ингибиторы тромбина	Прямые ингибиторы FXa	Непрямые ингибиторы FXa
Антитромбин	Анализ по FIIa	↑	Нет	Нет
	Анализ по FXa	Нет	↑	Нет
Протеин С*	коагулометрический	↑	↑	Нет
	хромогенный	Нет	Нет	Нет
Активность протеина S	коагулометрический*	↑	↑	Нет
DRVVT анализ на волчанку, ВА-скрининг и подтверждение	Время свертывания	↑	↑	Нет
ProC Global, APCR*	Время свертывания	↑	↑	Нет
FXIII	Хромогенное определение, активация FXIII через тромбин*	↓	Нет	Нет

* Ожидаемая тенденция на основе проведенных анализов.

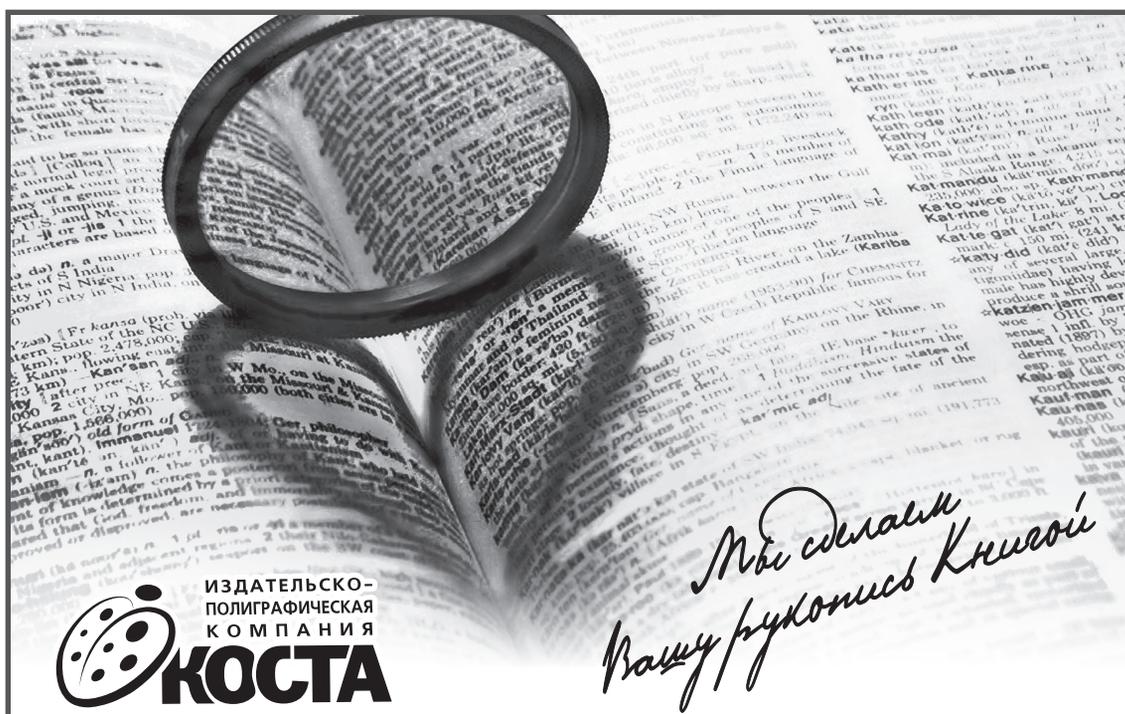
2. Если ПВ или АЧТВ используются для мониторинга, должна быть учтена различная реакция реагентов на различные препараты.

Таблица 3 представляет собой обзор влияний различных классов антикоагулянтов на параметры тромбофилии, основанный или на исследованиях *in vitro* или же на ожиданиях от обычно проводимых тестов. Все тесты, на которые было оказано влияние веществ, изменяются в силу зависимости от дозы препарата, и лечебные дозы имеют более сильное влияние, чем профилактические. С появлением описанных новых антикоагулянтов гораздо более важным стал тот факт, что образцы анализов на тромбофилию должны быть взяты до начала лечения антикоагулянтами.

Литература

1. Mani H., Hesse C., Stratmann G., Lindhoff-Last E. Rivaroxaban differentially influences ex vivo global coagulation assays based on the administration time // *Thromb. Haemost.* 2011; 106: 156–164.
 2. Samama M.M., Guinet C. Laboratory assessment of new anti-coagulants // *Clin. Chem. Lab Med.* 2011; 49: 761–772.

3. Hillarp A., Baghaei F., Blixter F. et al. Effects of the oral direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays // *J. Thromb. Haemost.* 2011; 9:133–139.
 4. Lindahl T.L., Baghaei F., Blixter I.F. et al. Effects of oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays // *Thromb. Haemost.* 2011; 105: 371–378.
 5. Samama M.M., Martinoli J.L., LeFlem L. et al. Assessment of laboratory assays to measure rivaroxaban — an oral, direct factor Xa inhibitor // *Thromb. Haemost.* 2010; 103: 815–825.
 6. Lindhoff-Last E., Samama M.M., Ortel T.L. et al. Assays for measuring rivaroxaban: their suitability and limitations // *Ther. Drug Monit.* 2010; 32: 673–679.
 7. Van Ryn J., Stangier J., Haertter S. et al. Dabigatran etexilate - a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity // *Thromb. Haemost.* 2010; 103: 1116–1127.
 8. Liesenfeld K., Schfer H.G., Troconiz I.F. et al. Effects of the direct thrombin inhibitor dabigatran on ex vivo coagulation time in orthopaedic surgery patients: a population model analysis // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2006; 62: 527–537.



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**