КАМЛД

ЛАБОРАТОРНАЯ МЕДИЦИНА

1 (2) 2012

КАЗАХСТАНСКАЯ АССОЦИАЦИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

www.labmed.kz

helena
Biosciences Europe

Автоматическая система капиллярного электрофореза нового поколения V8

Непревзойденная скорость и точность исследований

Ordamed
LABORATORIES

г. Алматы, ул. Ауэзова, 14а
БЦ "Берекет", 6 этаж
тел. + 7 (727) 323 66 80
e-mail: lab@ordamed.kz
www.ordamed.kz

ISSN 2225-806X
9 772225 806002

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Оборудование для ПЦР-диагностики компании BIONEER

Exicycler 96 амплификатор с детекцией в режиме реального времени - это передовая платформа для пользователей, нуждающихся в расширенных возможностях и максимуме настроек!

ExiPrep 16 полностью автоматическая система очистки ДНК/РНК/БЕЛКОВ- полностью исключает необходимость продолжительных ручных операций!

ExiStation™ молекулярная диагностическая станция

Автоматизированная станция **ExiStation** компании **Bioneer** является комплексным решением, для ПЦР-лаборатории, включающее три роботизированные станции для экстракции ДНК/РНК ExiPrep 16 Dx, миницентрифугу-вортекс для стрипованных пробирок ExiSpin и амплифика-тор для **ПЦР-РВ ExiCycler 96.**

Ordamed

ТОО "ОрдаМед Казахстан"
Республика Казахстан, 050009
г. Алматы, ул. Ауэзова, 14А
БЦ "Берекет", 6 этаж
Тел.: 8 (727) 323 6680, 270 7072
lab@ordamed.kz
www.ordamed.kz

ТОО «ОрдаМед Казахстан» - Официальный Дистрибьютор компании Bioneer на территории Республики Казахстан и Центральной Азии

- Астана: ул. Иманова 19, Деловой Дом "Алма-Ата", 10-й эт, каб.1003/б, Тел.: 8 (7172) 230-000, 8 (701) 766-93-83
- Петропавловск: ул. Чкалова, 48, оф. 224, Тел.: 8 (7152) 520-927, 8 (777) 512-44-54
- Актобе: ул. Уалиханова, 28/а. Тел.: 8 (7122) 969-067, 8 (775)11-83-00
- Караганда: ул. Бухар Жырау, 49. Тел.: 8 (7212) 42-65-59, 8 (701) 991-75-83
- Павлодар: ул. Сатпаева, 46 оф. 209. Тел.: 8 (7182) 329-411, 8 (701) 490-05-89
- Усть-Каменогорск: пр. Ауэзова, 35. Тел.: 8 (7232) 25-81-87, 25-10-55, 8 (705) 653-67-40
- Семипалатинск: ул. Абая, 102, 2 эт. оф.232. Тел.: 8 (7222) 526-953, 8 (702) 852-54-14

8 800 080 70 72 (звонок для регионов бесплатный)

КАМЛД

ЛАБОРАТОРНАЯ МЕДИЦИНА

1 (2) 2012

КАЗАХСТАНСКАЯ АССОЦИАЦИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

MedMedia KAZAKHSTAN

Зарегистрирован в Министерстве информации и культуры РК, свидетельство о постановке на учет №11928-Ж от 16.08.2011 г.

№1 (2) 2012

ИЗДАЕТСЯ с декабря 2011 года
ПЕРИОДИЧНОСТЬ - один раз в квартал
ТЕРРИТОРИЯ РАСПРОСТРАНЕНИЯ: Республика Казахстан
ТИРАЖ - 1000 экз.
СОБСТВЕННИК: ТОО «МедМедиа Казахстан»
ИЗДАТЕЛЬ: ТОО «МедМедиа Казахстан»

РЕДАКЦИЯ:
ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Гульжамал РАИСОВА
КОРРЕСПОНДЕНТ Альбина ЛУКПАНОВА
МЕНЕДЖЕРЫ ПО РЕКЛАМЕ: Юлия ЖУРАВЛЕВА, Елена ТУХВАТУЛЛИНА, Гаухар ШЕРУБАЕВА,
МЕНЕДЖЕР ПО РАСПРОСТРАНЕНИЮ Нуркен ЖАРЫЛКАСЫНОВ
ВЕРСТКА И ДИЗАЙН: Асель РАХИМБАЕВА, Сергей КИМ
ВОДИТЕЛЬ Едик ЖЕКСЕНБАЕВ

WWW.LABMED.KZ

Редакция не всегда разделяет мнение авторов публикации. Материалы, отмеченные значком*, публикуются на правах рекламы.
Ответственность за содержание рекламы несут рекламодатели. Рекламодатели предупреждены об ответственности за рекламу не зарегистрированных, не разрешенных к применению МЗ РК лекарственных средств и предметов медицинского назначения.
При перепечатке материалов ссылка на журнал «**ЛАБОРАТОРНАЯ МЕДИЦИНА**» обязательна.

АДРЕС РЕДАКЦИИ:
Республика Казахстан, 050000, г. Алматы, ул. Дуйсенова, 25
тел./факс: +7 (727) 330 29 00
+7 (727) 317 10 11
+7 (727) 317 10 00
+7 (727) 317 10 01
e-mail: info@medmedia.kz
www.medmedia.kz

ОТПЕЧАТАНО В ТИПОГРАФИИ:
ТОО «ПК Муравей»
Адрес: г. Алматы, ул. Толе би, 304
Тел.: +7 (727) 238 14 29, 238 14 28, 238 17 61

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Председатель редакционной коллегии – Рысулы М.Р.
Абильдинова Г.Ж., Абишев Т.Ж., Аблаев Н.Р. (зам. председателя редакционной коллегии), Баймуратова М.А., Бейсембаева Ш.А., Беляев Н.Н., (ответственный секретарь), Беркинбаев С.Ф, Длимбетов Е.Т., Жангелова М.Б., Искакова А.С., Калимулдаева С.Б., Ким Т.Я., Шибанова А.И., Цой И.Г.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Азизов И.С. (Караганда), Аканов А.А. (Алматы), Ахметов В.И. (Алматы), Ажибекова Р.Ж. (Алматы), Бекиров Д.С. (Алматы), Билялова К.И. (Алматы), Бисенова Н.М. (Астана), Булегенова М.Г. (Алматы), Денисов Ю.Д. (Алматы), Дурумбетов Е.Е. (Алматы), Жакипбаева Б.Т. (Алматы), Исраилова М.З. (Алматы), Канжегалина З.К. (Алматы), Каральник Б.В. (Алматы), Курманова Г.М. (Алматы), Лебедев А.С. (Астана), Маймакова А.М. (Алматы), Мека-Меченко Т.В. (Алматы), Мусаев А.Т. (Алматы), Мухаметкалиев Н.А. (Алматы), Мендешева Г.Г. (Алматы), Нурпеисов Т.Н. (Алматы), Ордабаев Ж.К. (Актобе), Плешкова С.М. (Алматы), Рамазанова Б.А. (Алматы), Сейдуалиева Б.С. (Алматы), Сейсембаев А.Ш. (Алматы),Тугамбаев Т.И. (Алматы), Тукеев М. (Алматы), Турланов К.М. (Алматы), Уразбаева Д.Ч. (Астана), Утешева Ж.А. (Алматы), Шопаева Г.А. (Алматы), Шортанбаев А.А. (Алматы).

www.kamld.kz

СОДЕРЖАНИЕ

НОВОСТИ 4

ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И ТЕСТ-СИСТЕМЫ 10

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ

Исмаилов Б.И., Исмаилов С.Б.
Гипотезы о роли митохондрии в развитии и регуляции уровня окислительного стресса в норме, при клеточных патологиях и реверсии опухолевых клеток 16

Аблаев Н.Р.
Гемоглобиновый тест: некоторые проблемы 23

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

Кишкун А.А.
Современная клиническая и лабораторная практика с позиций доказательной медицины 29

Сейдуалиева Б.С.
Современные технологии лабораторной диагностики в клинике 34

Ордабаев Ж.К., Жумагулова С.С., Давлетова Л.Н.
Западно-Казахстанская лабораторная медицина и некоторые общие проблемы ее совершенствования 36

Чащихина Е.
Лаборатория сегодня: современные возможности в сфере диагностики и сервиса* 39

БИОХИМИЯ

Иванов А.В.
Роль электрофореза в диагностике множественной миеломы 42

Аблаев Н.Р.
Гепсидин: откуда он взялся и зачем нужен 45

МИКРОБИОЛОГИЯ

Уразбаева Д.Ч., Бисимбаева С.К., Калина Н.В., Бекибаева Б.Д.
Идентификация дрожжевых грибов при помощи Integral System Yeasts Plus в диагностике кандидозов верхних дыхательных путей 50

Кулмамбетова Г.Н., Иманбекова М.К., Сукашев А.Т., Логвиненко А.А., Раманкулов Е.М.
Анализ взаимосвязи факторов патогенности Helicobacter pylori с развитием воспалительных заболеваний желудка 52

Жумабаева А.А., Касымханова И.Е.
Лабораторная диагностика кандидоза в амбулаторно-поликлинических условиях 56

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кожамкулов У.А., Шевцов А.Б., Ахметова А.Ж., Тарлыков П.В., Мухамедьяров Д.А., Раманкулов Е.М.
Молекулярно-генетические подходы изучения инфекционных заболеваний 58

Искакова А.Н., Романова А.А., Рахимова С.Е., Раманкулов Е.М.
Фармакогеномика – путь к персонализированной медицине..... 62

ИММУНОЛОГИЯ

Уразбаева Д.Ч., Орумбаева У.Л., Клодзинский А.А., Овчаренко Е.В.
Иммунофенотипирование в диагностике острых лейкозов..... 66

КОАГУЛОЛОГИЯ

Диагностическая значимость и клиническое использование теста Д-димер* 68

КАТАЛОГ ВЫСТАВКИ 73

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ДИАГНОСТИКИ РАКА И МЕТАСТАЗОВ

Американские ученые разработали диагностическую систему, позволяющую обнаружить раковые клетки в анализе крови, которая по точности диагностики сопоставима с биопсией опухоли. Руководитель разработки Питер Кун (Peter Kuhn) из Исследовательского института Скриппс в Ла-Хойе полагает, что в ряде ситуаций методика приближается по эффективности к биопсии. Новая диагностическая система, названная HD-CTC (circulating tumor cells – циркулирующие опухолевые клетки), с помощью цифрового микроскопа и программы обработки изображений анализирует образец крови, отделяя потенциально злокачественные клетки от эритроцитов и лейкоцитов.

Изображение отобранных «подозрительных» клеток, обладающих морфологическими признаками опухолевых, затем предоставляется гистологу, который делает окончательное заключение. Пять исследований эффективности новой методики показали, что по сравнению с применяемыми сейчас «обогатительными» системами (типа CellSearch), концентрирующими атипичные клетки, она значительно реже отсеивает раковые клетки на подготовительном этапе, что снижает риск ложноотрицательных результатов.

В ходе экспериментов HD-CTC смогла выявить метастазирующие опухоли у 43-80 процентов добровольцев (в зависимости от конкретного вида рака), в том числе на ранних стадиях заболевания, без единого ложноположительного заключения. Кроме того, новая система обеспечивает высококачественное изображение опухолевых клеток и их агрегатов в высоком разрешении. Как пояснил Кун, установки системы также с легкостью поддаются модификации для определения клеток другого типа, либо другим способом. HD-CTC рассчитывают применять как для наблюдения за развитием заболевания у выявленных пациентов, так и для скрининга на злокачественные опухоли.

ТРИГЛИЦЕРИДЫ – ФАКТОР И МАРКЕР РИСКА ИНСУЛЬТА У ЖЕНЩИН

Исследователи из колледжа Альберта Эйнштейна и Нью-Йоркского университета обнаружили, что высокие уровни ТГ являются сильнейшим фактором риска для инсульта среди пожилых женщин. То есть, они влияют на инсульт сильнее уровня липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). При наблюдении в течение 10 лет 90000 женщин в постменопаузе, ишемический инсульт имел место у 972 женщин. Как оказалось, при высоких уровнях ТГ риск инсульта был повышен в 2 раза.

Medicalxpress

МИКРОЖИДКОСТНЫЙ БЕСКОНТАКТНЫЙ ДАТЧИК-ЗОНД

Ученые корпорации IBM разработали гибкий бесконтактный микрожидкостный кремниевый датчик-зонд, который может помочь исследователям, лечащим врачам, патологоанатомам и судебно-медицинским экспертам в более точном анализе образцов биологических тканей для диагностики заболеваний и медицинских и фармацевтических исследований. Зонд позволяет окрашивать микроскопический участок ткани практически с любым биомаркером, который может быть клинически значимым.

Это дает врачу возможность использовать несколько участков («пятен») окрашивания на одном и том же образце, что, в итоге, повышает точность диагноза. «Эта работа может стать преобразующей для диагностики различных заболеваний, от рака до болезней сердца», – подчеркнул профессор д-р Али Хадемхосейни (Ali Khademhosseini), адъюнкт-профессор Гарвардской медицинской школы (Harvard Medical School) и Женской Больницы Бригхэма (Brigham and Women's Hospital) в Бостоне.

Статья опубликована в научном журнале Lab on a Chip, описывает инновационную технологию, получившей название «microfluidic probe» (микрожидкостный датчик-зонд), которая позволяет с высокой точностью окрашивать участки биологической ткани на микронном уровне. Датчик-зонд с микрожидкостной кремниевой головкой, разработанный учеными IBM, имеет ромбовидную форму 8-миллиметровой ширины, с двумя микроканалами у одной из вершин. Подобно картриджу струйного принтера, головка («наконечник» с микроканалами) датчика-зонда впрыскивает жидкость на поверхность образца ткани, но, затем, в отличие от принтера, головка непрерывно «отсасывает» жидкость, чтобы предотвратить распространение и накопление ее на поверхности, что может привести к «передержке».

В частности, для анализа участка ткани датчик-зонд может доставлять антитела к определенным участкам ткани с высокой точностью. Поскольку анализ можно производить на отдельных точечных или линейных участках, а не на всей поверхности ткани, образец лучше сохраняется для проведения дополнительных тестов, если они потребуются. Кроме того, для выполнения анализа необходимо всего несколько пиколитров (одна триллионная часть литра) реактива, содержащего антитела.

«Этот новый подход позволит специалистам окрашивать образцы биологической ткани с точностью микронного уровня и с легкостью использовать для серии анализов несколько отдельных участков ткани на ограниченной поверхности образца», – подчеркнул Говинд Кайгала (Govind Kaigala), ученый из исследовательского центра IBM Research – Zurich. Данное исследование опирается на многолетний опыт работы IBM с кремниевыми материалами, которые сегодня применяются в новейших микро- и нанотехнологиях для решения сложнейших задач в самых разных областях, от производства и потребления энергии до здравоохранения. Микрожидкостный датчик-зонд подходит для стандартных рабочих процессов в традиционной патологии. Кроме того, он совместим с существующими в настоящее время биохимическими системами окрашивания (образцов тканей) и устойчив к широкому спектру химикатов.

Малый размер датчика также позволяет с легкостью осматривать образец сверху и снизу с помощью инвертированного микроскопа, широко используемого в научно-исследовательских и клинических лабораториях. «Разработанная система может найти широкое прикладное применение в случаях, когда возможен забор образцов ткани только малого размера и требуется выполнение разных видов биологического анализа. Я уверен, что в один прекрасный день этот подход позволит нам брать малые образцы биопсийной ткани и получить по ним значительно больше информации, чем это возможно сегодня», – добавил профессор Хадемхосейни.

it.siteua.org

ПРОКАЛЬЦИТОНИН ВЫЯВЛЯЕТ ОСТРЫЙ ПИЕЛОНЕФРИТ У ДЕТЕЙ

У детей с первичной фебрильной инфекцией мочевыводящих путей ПКТ предсказывает риск повреждения почек. «Наше исследование показало, что низкие уровни ПКТ могут быть достаточно информативным скрининговым тестом для исключения в ОНТ острого пиелонефрита у детей с фебрильной инфекцией мочевых путей», – считает др. Chung (Shan Medical University Hospital, Taichung), который с коллегами проспективно обследовал 112 детей в возрасте до 2 лет. Сканирование почек с Тс-99-димеркаптоянтарной кислотой (ДМЯК) выявило острый пиелонефрит у 76 детей, и инфекцию более низких мочевых путей у 36. Средние значения уровней ПКТ, СРБ и количества лейкоцитов были значительно выше в группе острого пиелонефрита. Значения AUC ROC составили: 0,910 для ПКТ; 0,770 для СРБ и 0,594 для количества лейкоцитов. Это указывает на то, что ПКТ информативнее для дифференциального диагноза острого пиелонефрита и его дискриминации от инфекций нижних отделов мочевого тракта. Пограничное значение для максимальной диагностической эффективности ПКТ при диагностике острого пиелонефрита – 1 нг/мл, с чувствительностью 82% и специфичностью 92%. Сканирование было повторено через 6 месяцев. Начальные и пост-антибиотические уровни ПКТ, но не СРБ и не значения количества лейкоцитов, были значительно выше у детей с повреждением почек, чем без повреждения. У всех детей с рубцовыми изменениями почек уровни ПКТ были выше 2 нг/мл. Кроме того, на значения у ПКТ влияла только тяжесть повреждения почек, и эти значения не зависели от возраста. В целом, клиническое использование ПКТ может помочь идентифицировать детей, поступающих в ОНТ с острым пиелонефритом.

ПОМОГАЕТ СКРИНИНГ КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ НА БИЛИРУБИН

Массовый скрининг крови новорожденных на билирубин позволяет выявить детей с высоким риском тяжелой желтухи, которая может приводить к судорогам и повреждению головного мозга.

При анализе определяют содержание в крови желчного пигмента билирубина, образующегося при разрушении эритроцитов. Ученые обнаружили, что высокий уровень билирубина в крови новорожденных связан с риском желтухи. В отчете об исследовании, который вошел в журнал «Педиатрия» (Pediatrics), отмечается, что высокий уровень билирубина в крови указывает на вероятность того, что желтуха станет тяжелой. «Мы знаем, что раннее определение уровня билирубина, прежде чем он достигнет токсической величины, важно, – объясняет автор исследования д-р Michael Kuzniewicz, неонатолог из детской больницы при Калифорнийском университете в Сан-Франциско. – Но при этом до сих пор анализ крови на билирубин не был показан всем новорожденным, и врачи решали, каким детям его проводить, на основе симптомов и клинических факторов риска».

Исследователи выяснили, как влияет на здоровье новорожденных, появившихся на свет в лечебных учреждениях при медицинском центре Kaiser Permanente в Северной Калифорнии, введение в практику рекомендаций Американской педиатрической академии по массовым исследованиям на желтуху. Согласно этим рекомендациям, анализ крови на билирубин или клиническое обследование следует проводить всем новорожденным.

«Наши данные показывают, что массовые исследования новорожденных на билирубин, пока еще они находятся в роддоме, служат эффективным методом предотвращения роста его уровня до величины, которая может повредить головному мозгу малышей», – пишет д-р Kuzniewicz.

Источник: Солвэй Фарма

С ПОМОЩЬЮ ДЕТЕКЦИИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Группа ученых из Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе (UCLA) создала миниатюрный аналог «липкой ленты», который способен эффективно вылавливать из кровотока раковые клетки. Новое устройство представляет собой кремниевую пластинку размером 1 на 2 сантиметра. Ее покрывает слой кремниевых ворсинок поперечником в нанометры и длиной в микрометры, выглядящий словно ковер с крупным грубым ворсом. В свою очередь «ворс» этот покрыт антителами anti-EpCAM, способными распознавать и захватывать раковые клетки. Такую «ершистую» пластинку назвали соответственно silicon-nanopillar array (SiNP).

Для определения эффективности устройства авторы исследования создали аналогичную по размеру пластинку с ровной поверхностью, которую так же покрыли anti-EpCAM. И обе поместили в питательную среду, в которой культивировались клетки рака молочной железы. Оказалось, что пластинка с ворсом вылавливала из раствора 45-65% раковых клеток, а гладкая пластинка – только 4-14%. В среднем по серии опытов получалось, что наноструктурированная поверхность позволяет новому фильтру захватывать в 10 раз больше клеток, чем гладкому.

По словам одного из авторов работы Шутао Вана (Shutao Wang), наноструктура позволяет пластинке лучше взаимодействовать с микроскопическими элементами на поверхности клеток, что и повышает эффективность улавливания. Создатели SiNP полагают, что система станет производительной и при этом недорогой альтернативой ныне существующим методам диагностики рака. Дело в том, что так называемые циркулирующие опухолевые клетки, присутствующие в кровотоке, могут предоставить важную информацию о заболевании на той ранней стадии, когда биопсия не способна дать ничего. Кроме того, те же самые клетки, выловленные из образца крови, могут рассказать о прогрессировании болезни или, напротив, – продвижении в ее лечении. Определение же числа клеток, захваченных пластинкой, происходит просто: для их свечения применяется флуоресцентный маркер, а далее SiNP помещают под взор автоматизированного микроскопа – подсчет клеток выполняет несложная программа.

Авторы технологии также подобрали два разных флуоресцентных маркера, каждый из которых связывался либо только с живыми, либо только с умершими клетками. Данный прием расширяет возможности диагностики, утверждают ученые. Важно и то, что традиционные методы анализа крови на наличие циркулирующих опухолевых клеток требуют минимум 3-4 часа времени, в то время как с SiNP та же задача может быть решена за два часа. Детали эксперимента изложены в пресс-релизе университета и статье в Angewandte Chemie 2009.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ТЕСТ VENDYS ®

Диагностический тест VENDYS ® разработан доктором Мортеза Нагави и исследователями Техасского института сердца в Хьюстоне. Результаты последних клинических испытаний тест системы VENDYS ® были представлены на ежегодной конференции Американской ассоциации кардиологов в Новом Орлеане в 2008 году. Исследование показало, что простой недорогой тест, который измеряет изменение температуры на кончиках пальцев, может помочь обнаружить скрытые коронарные болезни. Результаты неизменно свидетельствуют о сильной корреляции между температурой пальцев и количеством коронарных бляшек. Чем ниже температура, тем больше скоплений коронарных бляшек и выше риск будущего инфаркта.

VENDYS является единственным неинвазивным тестом, обладающим высокой прогностической ценностью для выявления высокого риска коронарных больных. Аналогичные результаты наблюдаются при КТ ангиографии, а также при других исследованиях.

Тест отражает сосудистую функцию, которая зависит от многочисленных факторов риска и защитных факторов так же, как кровяное давление. Кроме того, в отличие от коронарного кальция или толщины интимы-медии сонных артерий, это динамический маркер, который быстро меняется по мере прогрессирования или регрессии болезни.

Современные методы скрининга и ранней диагностики сердечно-сосудистых заболеваний включают анализ крови для измерения традиционных факторов риска (например, высокий холестерин) или неинвазивных методов измерения, таких как компьютерная томография и МРТ. Наряду с традиционными факторами риска эти методы являются хорошими для долгосрочного прогнозирования будущих сердечно-сосудистых заболеваний, но они не оценивают состояние сосудистой системы человека. Кроме того, передовые условия изображения являются дорогостоящими (например, МРТ) или создают опасные излучения (например, КТ), поэтому они не могут использоваться часто (еженедельно или ежемесячно).

Диагностический тест VENDYS ® призвана помочь врачам в решении двух основных проблем, которые существуют сегодня, а именно: 1) не достаточно точной индивидуальной оценке риска сердечно-сосудистых заболеваний, и 2) отсутствии должного контроля за сосудистой реакцией на лечение.

Источник: www.endothelix.com

НОВЫЕ ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ (ИХТ)

Высокая чувствительность метода предполагает получение наиболее точного результата анализа, а скорость проведения исследования позволяет вовремя назначить необходимое лечение.

«Рота Стик» (для определения антигена ротавируса). Ротавирус является одной из главных причин детских гастроэнтеритов и диарей. При отсутствии лечения осложненная ротавирусная инфекция проявляется тяжелым обезвоживанием и нарушением электролитного баланса организма, особенно у новорожденных и детей раннего возраста.

Ротавирус является причиной госпитализации новорожденных и детей дошкольного возраста с острыми кишечными инфекциями, вызывая поражения эпителия слизистой оболочки тонкой кишки, сопровождающиеся развитием диарейного синдрома (до 50% случаев).

Пик заболеваемости в странах с умеренным климатом приходится на холодные месяцы года. Наиболее подвержены влиянию ротавируса пожилые люди с сопутствующими заболеваниями. Диагностика ротавирусных гастроэнтеритов основана на обнаружении ротавирусов с помощью электронной микроскопии или с помощью иммунологических методов, одним из которых является метод иммунохроматографии (ИХТ).

Основные характеристики: чувствительность 97,3%, специфичность 97,4%, пороговая концентрация антигена 106 частиц/мл.

Материал для исследования: фекалии.

«Рота/Адено Комби Стик» (для определения антигенов аденовируса человека и ротавируса). Тест предназначен для одновременной комплексной диагностики рота- и аденовирусов – двух наиболее часто диагностируемых этиологических агентов, вызывающих острые кишечные инфекции, сопровождающиеся тяжелыми формами диареи у детей.

Основные характеристики: совпадение положительных результатов с другими коммерческими тестами (указаны в инструкции производителя) – 97% в отношении ротавирусного антигена, 90% – в отношении аденовирусного; пороговая концентрация аденовирусного антигена 3,4 ? 106 частиц/мл, ротавирусного – 106 частиц/мл.

Материал для исследования: клеточные культуры, мазки и смывы со слизистой глаз, носоглотки, мазок из зева, носоглоточные аспираты, назальные смывы, фекалии.

«Адено Стик» (для определения антигена аденовируса). Аденовирус вызывает у людей поражения респираторного (фарингит, пневмония, острые респираторные синдромы) и желудочно-кишечного трактов (гастроэнтерит, в основном у детей), а также глаз (эпидемический кератоконъюнктивит, фарингоконъюнктивальная лихорадка, неспецифический фолликулярный конъюнктивит).

Тест-система «АденоСтик» позволяет выявлять специфические антигены всех известных (41) серотипов аденовируса человека.

Основные характеристики: чувствительность 100%, специфичность 88,9–93,8% (в зависимости от выбранного референс-метода), пороговая концентрация антигена 3,4 ? 106 частиц/мл.

Материал для исследования: клеточные культуры, мазки и смывы со слизистой глаз, носоглотки, мазок из зева, носоглоточные аспираты, назальные смывы, фекалии.

«Хелико Стик» (для определения антигена Helicobacter pylori. Helicobacter pylori – грамотрицательная бактерия, вызывающая поражение слизистой оболочки желудка. Заражение H. pylori может привести к хроническому гастриту, язве желудка и двенадцатиперстной кишки. H. pylori диагностируют примерно у 40-50% населения в развитых странах и у 80-90% в развивающихся странах.

Использование в иммунохроматографическом тесте «Хелико Стик» моноклональных антител к специфическому ферменту хеликобактерий (уреазе) позволяет повысить эффективность обнаружения бактерий и диагностическую значимость теста по сравнению с тестами, выявляющими антитела к H. pylori либо бактериальную каталазу.

Основные характеристики: чувствительность теста – 92,5%, специфичность теста – 95,0%, пороговая концентрация антигена – 100 нг/мл.

Материал для исследования: фекалии.

«E.coli Тест» (для определения антигенов E.coli O157:H7). E.coli O157:H7 – один из многочисленных штаммов кишечной палочки, продуцирующий веротоксин. Несмотря на то, что большинство штаммов кишечной палочки являются естественными обитателями кишечника животных (комменсалами), штамм O157:H7 вызывает серьезные повреждения эпителия и эндотелия толстого кишечника.

E.coli O157:H7 обнаруживают в кишечнике здоровых животных – крупного рогатого скота, оленей, коз, овец, которые являются резервуаром инфекции.

E.coli O157:H7 была идентифицирована как причина тяжелого геморрагического колита во время вспышки в 1982 г., связанной с употреблением в пищу контаминированных кишечной палочкой мясных продуктов. Начиная с первой вспышки и до настоящего момента было зафиксировано значительное количество случаев инфекции, связанной, главным образом, с употреблением в пищу непроваренного говяжьего мяса, сырого молока, некипяченой воды и т. п.

Основные характеристики: чувствительность 100%, специфичность 85%.

Материал для исследования: фекалии.

«C.difficile ТОКСИН A+B Тест» (для определения токсинов A и B C.difficile). Clostridium difficile – возбудитель антибиотик-ассоциированной диареи и псевдомембранозного колита. На сегодняшний день данный инфекционный агент является одним из наиболее часто регистрируемых микроорганизмов, вызывающих внутрибольничные инфекции (в стационарах и домах престарелых).

Микроорганизм может быть изолирован из нескольких естественных местообитаний – из почвы, сена, песка, экскрементов животных (коров, мышей, лошадей, мелких домашних животных) и человека. C.difficile обладает по крайней мере тремя потенциальными факторами вирулентности, из которых основную роль в патогенезе инфекций, ассоциированных с данным возбудителем, играют токсины A и B.

Токсин A – это энтеротоксин, по всей вероятности, взаимодействующий с цитоскелетом эпителиальных клеток кишечника, нарушая их нормальное функционирование, тогда как токсин B – это цитотоксин, оказывающий сильнейший цитопатический эффект в культурах клеток и тканей. Не все штаммы C.difficile продуцируют токсины, вследствие чего примерно 2% здоровых взрослых людей и по крайней мере 50% детей младше 2 лет являются бессимптомными носителями инфекции. По этой причине идентификация токсинов A и B в образцах фекалий пациентов является в данном случае более значимым диагностическим методом, чем культивирование клостридий на питательных средах (учитывая также, что клостридии – труднокультивируемые микроорганизмы).

Основные характеристики: чувствительность 86,7%, специфичность 91,7%, пороговая концентрация антигена 4 нг/мл.

Материал для исследования: фекалии.

«Стреп B Стик» (для определения антигена стрептококков группы B). Стрептококки группы B наиболее известны как возбудители сепсиса и менингита новорожденных.

По клиническим и эпидемиологическим критериям выделяют две формы заболевания: а) раннее проявление симптоматики, в первые 10 дней после родов (внутриутробное заражение и заражение вследствие прохождения через инфицированные родовые пути матери); б) отсроченное проявление симптомов (по истечении 10 дней после родов, госпитальная инфекция). Смертность новорожденных в результате стрептококковой инфекции составляет 22-80% от числа заболевших (1-5% от общего количества родов).

Для проведения профилактической санации матери с применением антибиотиков необходима корректная идентификация патогена в родовых путях матери. На сегодняшний день для идентификации стрептококков группы B применяют несколько диагностических методик, в числе которых и иммунохроматография.

Основные характеристики: чувствительность 88,4%, специфичность 97,9%.

Материал для исследования: мазок из влагалища.

«Стреп A Стик» (для определения антигена стрептококков группы A). Среди бета-гемолитических стрептококков наиболее важное значение имеют стрептококки групп A, B, C и G. В частности, стрептококки группы A вызывают такие заболевания, как острый стрептококковый фарингит и другие гнойные инфекции, а также играют роль в развитии ревматических проявлений и острого гломерулонефрита после перенесенной стрептококковой инфекции.

Для целесообразного назначения терапевтических препаратов необходим точный и эффективный метод диагностики инфекционного агента. Основные диагностические методики изучения и выявления данного возбудителя: в первую очередь, изоляция культуры возбудителя («золотой стандарт»), а также последующее исследование антибиотикочувствительности культур с помощью бацитрациновых дисков, помещенных на кровяной агар, реакция латекс-агглютинации, разнообразные иммунологические методики, в том числе ИФА и иммунохроматографический метод.

Основные характеристики: чувствительность 97%, специфичность 95%.

Материал для исследования: мазок из зева.

«Гонорея Стик» (для определения антигена гонококка). N.gonorrhoeae – грамотрицательный диплококк, вызывающий 15-32% всех уретритов у мужчин.

В 85-90% случаев уретрит, вызванный гонококками, протекает симптоматически. Окрашивание по Граму (бактериоскопия чаще применяется для исследования материала, полученного от мужчин) и культивирование уретральных образцов (у женщин) и мазков с шейки матки до сих пор являются наиболее распространенными методиками исследования в целях подтверждения и диагностики гонококковой инфекции.

Применяется и ряд иммунологических тестов (РИФ, ИФА). Чувствительность и специфичность иммунохроматографического теста сопоставима (а для некоторых тестов выше по указанным показателям) с названными методиками, а время, затраченное на проведение теста, значительно короче. На результаты данного анализа не оказывают эффекта принимаемые пациентом лекарственные препараты. Тест не требует использования специального оборудования.

Основные характеристики: чувствительность 98,3%, специфичность 97,8%.

Материал для исследования: мазок из уретры, мазок из влагалища.

«Giardia intestinalis Тест» (для определения антигенов G.intestinalis). Гиардиоз широко распространен во всем мире, G.intestinalis инфицирует ЖКТ, вызывая диарею.

G.intestinalis – жгутиковое простейшее, также известное в литературе под названиями G.lamblia и G.duodenalis. Случаи лямблиоза регистрируют повсеместно, однако наиболее часто – в развивающихся странах с низким уровнем санитарно-эпидемиологического контроля и очистки питьевой воды (Африка, Азия, Южная и Центральная Америка). В указанных регионах практически все жители поражаются данным микроорганизмом несколько раз в детском возрасте, при этом заболеваемость среди детского населения находится на высоком уровне и колеблется в пределах 10-30%. В развитых странах уровень заболеваемости составляет от 2 до 5% (от всех зарегистрированных случаев инфекционной диареи), при этом инциденты заболевания связаны, в основном, с употреблением контаминированной питьевой воды, передачей инфекции от человека к человеку, инфицированием в путешествиях, в ходе пребывания у зараженных рекреационных источников.

Основные характеристики: чувствительность > 99%, специфичность > 99%.

Материал для исследования: фекалии.

«Giardia/Cryptosporidium Тест» (для определения антигенов G.intestinalis и C.parvum). Криптоспоридиоз – кишечная зооантропонозная инфекция, вызываемая паразитическим микроорганизмом рода Cryptosporidium. Микроорганизм имеет внешнюю защитную оболочку, позволяющую ему успешно выживать в окружающей среде (даже при обработке хлорсодержащими дезинфектантами) в течение долгого времени.

Основные характеристики: чувствительность > 99%, специфичность >99% для обоих возбудителей.

Материал для исследования: фекалии.

«FOB Тест» (для определения скрытой крови в фекалиях). Колоректальный рак (рак толстой и прямой кишки) – заболевание, поражающее 600 000 человек ежегодно.

Колоректальный рак занимает третье место по частоте заболеваемости среди других форм онкологических заболеваний. Как и в случае прочих форм опухолей, ранняя диагностика рака повышает эффективность терапии и процент выживаемости пациентов.

Среди пациентов старше 45 лет у 10% диагностируют колоректальные полипы, из которых 1% представляет собой злокачественные новообразования. Кровеносные сосуды на поверхности колоректальных образований (особенно тех, размер которых превышает 0,5 см) часто хрупки и легко повреждаются каловыми массами, выделяя небольшое количество крови в просвет кишки. Скрытую кровь обнаруживают и при возникновении других патологий, таких как, например, инфекционных заболеваний ЖКТ, а также язвенной болезни.

Обнаружение крови в кале является более простым и доступным скрининговым методом, по сравнению, например, с колоноскопией. Химические реакции, лежащие в основе традиционных методов диагностики скрытой крови в кале, основанные на псевдопероксидазной активности эритроцитов, чаще всего обеспечивают лишь минимальный уровень чувствительности и специфичности, недостаточный для эффективного скрининга.

Иммунологические методики диагностики скрытой крови характеризуются более высокими показателями чувствительности и специфичности и значительно более просты технологически, по сравнению с классическим гваяковым тестом.

Основные характеристики: специфичность 91-94% в зависимости от используемого клинического критерия и типа референс-теста.

Материал для исследования: фекалии.

Количественное экспресс-определение кальпротектина в образцах кала (Buhlmann, Швейцария). Фекальный кальпротектин (ФК), белок нейтрофилов кишечника. Метод дает возможность получить первые результаты без рентгенологического и/или эндоскопического исследования.

ФК – сильнейший прогностический маркер клинического рецидива для болезни Крона (БК) и язвенного колита (ЯК) у пациентов с бессимптомной стадией. Тест является инструментом диагностического контроля и оптимизации лечения/подбора терапии, уменьшает число инвазивных исследований.

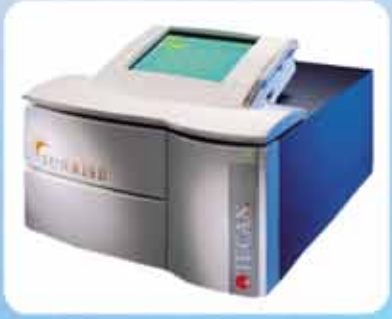
Определение кальпротектина обеспечивает неинвазивную дифференциацию между синдромом раздраженной кишки (СРК) и воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК); дает возможность мониторировать течение болезни/терапию болезни Крона язвенного колита; положительные результаты анализа на фекальный кальпротектин (ФК) могут служить показанием для проведения колоноскопии.

www.labtechperm.ru

ДЕЛЬРУС

- ЛАБОРАТОРНОЕ И МЕДИЦИНСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ ВЕДУЩИХ МИРОВЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ
- СЕРТИФИЦИРОВАННАЯ СЕРВИСНАЯ СЛУЖБА

Автоматический ИФА анализатор (Robion AG (Швейцария)


Микропланшетный фотометр (Tecan Austria GmbH, АВСТРИЯ)

Микропланшетный промыватель (Tecan Austria GmbH, АВСТРИЯ)

Автоматизированная ПЦР-пробоподготовка (TECAN Schweiz AG, Швейцария)

Оборудование для микрочипов (TECAN Schweiz AG, Швейцария)

Иммунный блотинг (Tecan Austria GmbH, АВСТРИЯ)

Автоматизированное низкотемпературное хранилище (Liconic Лихтенштейн)

Биохимия (Audit Diagnostics, Ирландия)

СОЭ-метрия (ALIFAX S.p.A., ИТАЛИЯ)

Оборудование и расходный материал для стволовых клеток (Biosafe S.A. Швейцария), (CellGenix Германия), (Termogenesis США)

Гелевая изосерология (DiaMed AG Швейцария)

Тромбоэластография (Haemoscope США).

Центральный офис в Республике Казахстан ТОО «Дельрус РК» 010000, г. Астана
тел.: (7172) 31-98-07, 73-81-08, внутр.118 факс (7172)31-57-21, моб. 8 701 730 79 03
E-mail: delrus@delrus-rk.kz, info@delrus-rk.kz, mag@delrus-rk.kz
www.delrus-rk.kz

АВТОМАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА РАСТВОРИМОСТИ ROBODIS

Со своей новой системой RoboDis компания ERWEKA открыла новый этап в сфере профессионального автоматизированного тестирования растворимости. Данная система была разработана в тесном сотрудничестве с фармацевтической компанией Bayer Healthcare и, таким образом, является результатом внедрения производственного опыта в сфере оптимизации процессов, автоматизации методов и контроля качества, который складывался на протяжении более 15 лет.

Система RoboDis® способна автоматически выполнять более 20 тестов. Для увеличения производительности система оснащена двумя тестерами растворимости (по 8 станций в каждом), которые обслуживаются с помощью робота. В результате этого новшества работа всей системы является более совершенной и эффективной, чем работа традиционных автоматических тестеров.

Система RoboDis® объединяет в себе гибкую работу робота (по методам USP 1, 2 и 5; смена среды по методам USP A и B; применение японских грузил и т.д.) и скорость выполнения задач традиционного автоматического тестера растворимости (одновременное наполнение сосудов, вбрасывание таблеток, взятие пробы и т.д.).

Анализ проб осуществляется с помощью оптоволоконного датчика, УФ-Вид. спектрофотометра или ЖХВД.

В качестве дополнительной функции к системе RoboDis® прилагаются видеокамеры, работающие в замедленном режиме, что позволяет определить появление помех при тестировании, таких как образование конуса и т.п.

Система RoboDis® полностью соответствует действующим стандартам фармацевтической промышленности, таким как 21 CFR Часть 11, GAMP (текущее издание), CGMP (FDA), Нормативы GMP для ЕС, Директива EMC согласно EN 61010,

Нормативы Ассоциации фармацевтической промышленности США (PMA) о проведении квалификации и компьютерной валидации оборудования

erweka-rus.ru

ВАКУУМНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЗЯТИЯ КРОВИ

Используя вакуумные системы для взятия крови в своей лаборатории вы получите:

- безопасность персонала на всех этапах подготовки, взятия, хранения, транспортировки и обработки образца;
- быстроту взятия крови: на одну пробирку затрачивается 5-10 секунд, а также возможность набрать кровь в две и более пробирки согласно сделанным назначениям за очень короткий промежуток времени;
- безопасность пациента – использование одноразовых пробирок и игл.

Взятие крови непосредственно в закрытую пробирку предотвращает случайное разлитие биоматериала. Силиконовое покрытие игл предотвращает тромбообразование. Такие системы удобно транспортировать – даже при переворачивании контейнера или штатива с пробирками крышки не откроются. Наличие переходников к системам Люер позволяют избежать повторных венопункций для введения внутривенно лекарственных препаратов. Стандартная маркировка пробирок позволяет быстро и четко рассортировать их по отделам внутри лаборатории. Совместимость с любыми автоматическими анализаторами, что дает возможность работать из первичной пробирки и снижает временные затраты медперсонала. Персонал лаборатории не должен вручную расфасовывать антикоагулянты по пробиркам.

Пробирки легко центрифугируются без дополнительной необходимости «обводить» кровь. Центрифугирование с закрытой пробкой позволяет избежать воздушно-капельного распыления микрочастиц крови при открытии центрифуги.

Максимальное снижение возможной преаналитической ошибки: четко дозированный вакуум позволяет соблюсти точное соотношение кровь/реагент (антикоагулянт). Каждая пробирка набирает строго заданный объем крови, заводские метки на этикетке пробирок позволяют подбирать наиболее подходящую по объему пробирку. Наличие на каждой пробирке бумажной этикетки позволяет маркировать биоматериал обычными ручками или фломастерами не приобретая маркеры по стеклу.

Широкий спектр наполнителей для различных видов анализов обеспечивает более длительное сохранение исследуемых показателей. Постоянный контроль качества продукции гарантирует ее соответствие международным стандартам ISO и CE. Возможность использования пробирок при работе с автоматическими анализаторами.

Простота утилизации. Благоприятное впечатление, которое производит на пациента манипуляция с использованием названных систем.

Соблюдение всех правил и неукоснительное следование инструкции по применению позволит в каждом лечебном учреждении повысить качество лабораторных исследований и сократить число повторных назначений анализов.

АВТОМАТИЧЕСКИЙ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР CELL-DYN RUBY

Производительность: общий подсчет клеток + дифференциал лейкоцитов до 76 в час. Объем образца: ручной режим – 150 мкл, режим автоподачи – 230 мкл. Только 4 реагента, включая ретикулоциты

Технология:

- лейкоциты: 4 угловой оптический анализ скаттерограмм MAPSS™;
- тромбоциты: двуугловой оптический анализ без необходимости повторного тестирования;
- ретикулоциты: новые методы с метиленовым синим NCCLS, технология быстрой окраски.

Обработка данных:

- операционная система основана на Microsoft Windows®;
- сенсорный монитор;
- встроенный контроль качества с использованием правил Westgard и кривых Levey-Jennings®; с базой данных не менее, чем 10000 результатов со скатерограммами.

Возможность создания рабочего листа; программируемые границы норм пациентов; полные данные о пациенте; считывание штрих кодов: Code 39, Codabar, Code 128, Interleaved 2 of 5, ISBT; on-line помощник проведения автокалибровки; электронное руководство по диагностике и эксплуатации.

АВТОМАТИЧЕСКИЙ ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР ARCHITECT I2000

Производительность: 200 тестов в час.

Технология: хемилюминесцентный иммуноанализ на парамагнитных частицах.

Единый мультифункциональный пробозагрузчик:

- одновременная загрузка 135 образцов на мультифункциональный загрузчик с фронтальным доступом;
- 35 позиций для срочных образцов, калибраторов, контролей;
- универсальные штативы для образцов, калибраторов, контролей.

Возможность единовременной работы с различными типами пробирок; автоматическое разведение, повторное и рефлексное тестирование; приоритет срочных тестов перед рутинными.

Режим работы с образцами: произвольный, последовательный и немедленный.

Время до получения первого результата:

- 29 минут стандартные протоколы;
- 18 минут укороченные протоколы.

Современные уникальные технологии:

- система детекции сгустка;
- усовершенствованная акридиновая метка (Chemiflex);
- гибкие протоколы (одно-, двухступенчатые, с преинкубацией, укороченные (STAT)).

Реагенты на борту: 25 в охлаждаемой карусели. Реагенты готовы к использованию без предварительной подготовки; упаковки на разное количество тестов.

Сенсорный экран, диагностика в режиме on-line, электронное руководство по эксплуатации. Возможность подключения к системе удаленной сервисной диагностики AbbottLink. Встроенный контроль качества с использованием правил Вестгарда и графиков Леви-Дженнингс. База данных результатов не менее, чем на 50 000 результатов.

Двунаправленный порт RS232C для подключения к лабораторной информационной системе и к другому ПО.

ПОРТАТИВНЫЙ АНАЛИЗАТОР МОЧИ ПОКЕТ КЕМ

Основные характеристики:

- 50 анализов/час;
- 10 параметров: глюкоза, белок, билирубин, уробилиноген, pH, кровь, кетоны, нитриты, лейкоциты, удельная плотность мочи;
- измерение по рефлексному 2-волновому принципу на 565, 635, 760 нм;
- память на 100 измерений;
- автотемпературная коррекция по pH;
- работает от сети и от батареек;
- размер 12 x 9 x 3 см, вес – 300 г.

АНАЛИЗАТОР СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ КРОВИ BN PROSPEC

Основные характеристики:

- 70 тестов/час;
- анализ через 12-15 мин.;
- на один тест 40 мкл реагента;
- одноразовые кюветы;
- на борту 45 реагентов и непрерывная загрузка образцов;
- встроенный холодильник для реагентов;
- авторазведение образцов;
- встроенная программа контроля качества (по Вестгарду);
- нефелометрический метод измерения обладает высокой точностью и специфичностью получаемых результатов;
- открытая система.

Тесты: IgG, IgA, IgM сабклассы IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, Ig легкие цепи - каппа, лямбда, FreeLite, ЦИК, RF, ASLO, hsCRP, сывороточный амелоидный белок, церулоплазмин, a1-гликопротеин, b2-макроглобулин, фибронектин, цистатин C, гомоцестин, APO A-I, APO A-II, APO B, APO E, Lp(a), миоглобин, преальбумин, трансферрин, гаптоглобин, гемопексин, ферритин, C3C, C4, C1-ингибитор и другие (список тестов постоянно расширяется).

МУЛЬТИЦЕНТРИФУГА СМ-6М

Надежность, простота и удобство в эксплуатации обеспечивают широкий диапазон применения прибора в медицине, биологии, аналитической химии и т.п.

Свойства:

- задание и отображение на световых индикаторах времени и скорости вращения ротора;
- блокировка крышки во время работы;
- датчик дисбаланса;
- звуковая сигнализация остановки ротора;
- автоматическая разблокировка и при открытии крышки после остановки ротора;
- бесшумная работа;
- цифровая сверхточная регуляция скорости вращения ротора;
- практически неограниченный режим непрерывной работы.

ЦЕНТРИФУГА ЛАБОРАТОРНАЯ ЦЛМН-Р10-01 «ЭЛЕКОН»

Центрифуга обеспечивает плавный разгон и плавное торможение вращения ротора.

Отключение двигателя и экстренное торможение вращения ротора в случае аварии. Автоматическое поддержание частоты вращения ротора с индикацией скорости на лицевой па-

нели. Автоматическое отключение двигателя через заданный интервал времени. Индикация времени работы (при отсутствии предварительного задания интервала времени работы). Блокировка включения двигателя при открытой крышке.

Блокировка открывания крышки при работающем двигателе. Работу с максимальным объемом центрифугата 150 см³. Неуравновешенность масс в диаметрально противоположных гильзах – до 2 г.

Технические характеристики:

- номинальный объем центрифугата, см³ – 100
- количество мест в роторе – 10
- скорость вращения ротора центрифуги – от 500 до 2700 об./мин. с шагом 100 об./мин.
- точность поддержания скорости вращения ротора центрифуги, об./мин. – 100
- диапазон установки задатчика интервала времени работы – от 1 до 99 минут с шагом 1 минута
- применяемые пробирки – стандартные, цилиндрические и конические диаметром до 17 мм, высотой до 150 мм
- питание от сети переменного тока – (50±0,5) Гц; (220±22) В
- потребляемая мощность, не более, Вт – 200
- масса центрифуги с комплектом запасных частей и принадлежностей, не более, кг – 10
- габаритные размеры центрифуги, не более, мм – 460 x 405 x 270

МИКРОСКОП МИКМЕД-6

Микроскоп медицинский Микмед-6 предназначен для наблюдения изображения объектов в свете видимой люминесценции и используется в клинической лабораторной диагностике для проведения экспресс-диагностики различных заболеваний иммунофлуоресцентным методом, а также в биологии при исследовании различных материалов, пищевых продуктов и т.п.

Набор светоделительных блоков со светофильтрами обеспечивает флюоресцентные исследования объектов, обработанных Fluorescein isothiocyanate (FITC) и красителями типа Propidium iodide, Rhodamine и др.

Микроскоп поставляется в тринокулярном варианте и с пятигнездным револьвером. Микроскоп может быть оснащен адаптером и цифровой камерой для визуализации и компьютерного анализа.

МИКРОСКОП MICROS MC-300 FS

Люминесцентный микроскоп для лабораторных исследований. Эргономичный современный дизайн. Реверсное револьверное устройство крепления пяти объективов. Люминесцентный осветитель отраженного света с ртутной лампой 100 Вт. Блок люминесцентных светофильтров. Дополнительные люминесцентные объективы. Система освещения проходящего света по принципу Келера. Координатный предметный столик со стеклянным вкладышем. Противогрибковое покрытие оптики.

Микроскоп для профессиональных люминесцентных работ в медицине и биологии

Опция: возможно светодиодное (LED) освещение в проходящем свете

АНАЛИЗАТОР ГЛЮКОЗЫ «ЭНЗИСКАН УЛЬТРА»

Анализатор глюкозы автоматический мембранного типа предназначается для количественного определения концентрации глюкозы в пробах крови, сыворотки, мочи и других биологических жидкостей в диапазоне концентраций от 2 до 30 ммоль/л глюкозооксидазным методом.

Анализатор может быть использован в экспресс-лабораториях и клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений (больниц, поликлиник, диспансеров, санаториев, родильных домов, служб крови).

Принцип действия анализатора основан на определении амперометрическим способом концентрации перекиси водорода, образующейся в результате расщепления глюкозы ферментом глюкозооксидазой. В результате реакции образуется электрический ток, который преобразуется в постоянное напряжение и измеряется аналогово-цифровым преобразователем.

Особенности анализатора:

- производительность зависит от концентрации глюкозы в пробе;
- производительность средняя – 90 проб/час;
- производительность максимальная – 120 проб/час;
- объем исследуемой пробы 50 мкл.

Исследуемые материалы: кровь (капиллярная, венозная, артериальная); сыворотка/плазма; моча; ликвор.

Электроника заботится об экономии электрической энергии; используются только экологически чистые утилизируемые материалы.

ТЕРМОЦИКЛЕР PALM CYCLER

Corbett Research кардинально изменила программируемый интерфейс современного термоциклера, сохраняя при этом все возможности оборудования высочайшего класса.

Программное обеспечение загружается в микрокомпьютер типа Palm, интегрированный в термоциклер, обеспечивая непревзойденное качество пользовательского интерфейса. Сам Palm может быть отсоединен от самого прибора, что позволяет связывать амплификатор с удаленным территориально пользователем. Модернизированное программное обеспечение можно легко загружать из интернета с веб-сайта фирмы-производителя.

Цветной экран микрокомпьютера идеален для легкого программирования вашего температурного профиля. Используя простой графический интерфейс, стандартный температурный профиль может быть заложен в память за секунды. Отдельные директории можно создавать для каждого пользователя лаборатории для хранения температурных профилей.

Windows CE Software позволяет использовать множество опций. Это возможность градиентного изменения температуры, «тач-даун» ПЦР, «лонг-рэндж» ПЦР, контроль за температурой блока, контроль скорости нагревания/охлаждения, авторестарт после отключения источника тока, полный отчет по всему процессу после его завершения.

Температурный градиент можно определять в любой точке термопрофиля.

Разброс температур слева направо между крайними позициями термоблока может достигать 24°С.

Мощность подаваемого напряжения на термоблок контролируется, что обеспечивает одновременное изменение градиента температуры. Температура для всех 12 колонок отображается на дисплее во время прохождения анализа, облегчая выявление оптимальных температурных условий.

Существует обширная, всесторонняя помощь on-line по всем функциям прибора. Для новых пользователей предусмотрена интерактивная помощь, где шаг за шагом дается руководство по программированию прибора.

Прибор может быть легко перекалиброван в случае необходимости в отсутствие сервисного инженера. Процедура калибровки заключается в постановке эксперимента с внешними измерителями температуры термоблока. Полученные данные вводятся в программу калибровки на каждом шаге температурного профиля и прибор автоматически перекалибруется.

Программа «Калькулятор олигов» заложена при производстве Software градиентного PalmCycler. Она проста в использовании и определении температуры плавления, оптической плотности, молекулярного веса и локализации вторичной структуры.

ТЕРМОЦИКЛЕР ROTOR GENE

Идентификация возбудителей инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (Real Time PCR). Особенностью данного метода является возможность количественного определения ДНК/РНК инфекционных возбудителей в исследуемом материале, отсутствие стадии электрофореза, менее строгие требования к организации ПЦР-лаборатории, а также автоматическая регистрация и анализ полученных результатов. Отсутствие стадии электрофореза позволяет снизить риск контаминации продуктами ПЦР. Регистрация результатов проводится непосредственно в процессе ПЦР, весь анализ можно проводить в одной-двух комнатах лаборатории и нет необходимости в отдельном помещении для детекции продуктов реакции.

Термоциклер Rotor Gene – новейший прибор для проведения ПЦР в реальном времени, позволяющий проводить одновременную детекцию четырех инфекционных возбудителей в одной пробирке («мультиплексная ПЦР»). Одновременно возможно исследование 72 образцов. Rotor Gene имеет удобное управление, не требующее специальных знаний. В комплекте с прибором поставляется пакет прикладного программного обеспечения для получения данных в электронном формате.

Таким образом, термоциклер Rotor Gene позволяет быстро получить результат с минимальными затратами.

ПЦР-ДЕТЕКТОР «ДЖИН»

ПЦР-детектор предназначен для регистрации результатов ПЦР при использовании тест-систем, основанных на принципах флуоресцентной детекции. Обеспечивает возможность эффективной документации и хранения результатов ПЦР в компьютерной базе данных. Ориентирован на использование зондов и/или праймеров, меченных флуоресцентной меткой и тушителем флуоресценции. Позволяет регистрировать результаты ПЦР после проведения реакции, не открывая пробирки, благодаря чему решается проблема контаминации продуктами ПЦР и упрощаются требования к организации ПЦР-лаборатории. Значительно снижает трудоемкость и время проведения стадии детекции.

АНАЛИЗАТОР ОСАДКА МОЧИ FUS-100

Идентификация и классификация форменных элементов мочи согласно стандартам NCCLS. 820 изображений для каждого образца. Технология проточной планерной клетки без центрифугирования и окрашивания снижает стоимость анализа. Точная идентификация 12 форменных элементов мочи.

Технология проточной планерной клетки: благодаря обжимающей жидкости поток форменных элементов мочи всегда находится в фокусе линз микроскопа. Частицы мочи проходят мимо линз микроскопа и CCD камеры одна за другой, исключая наложение. Кроме того, поток мочи носит диффузионный характер, что препятствует агрегации видимых компонентов.

Высокоскоростная технология получения изображений: каждая картинка микроскопа подсвечивается вспышкой от источника света (40 раз в секунду), все проходящие форменные элементы мочи фиксируются камерой. CCD камера делает 820 изображений для каждого образца за определенное время.

Технология идентификации форменных элементов мочи: каждый видимый компонент изображения выделяется рамкой. Программное обеспечение немедленно производит классификацию форменных элементов мочи по форме. размеру, текстуре, контрасту и другим параметрам.

Автоматически определяемые форменные элементы: эритроциты, лейкоциты, лейкоцитарные сгустки, гиалиновые цилиндры, патологические цилиндры, бактерии, squamous клетки эпителия, non-squamous клетки эпителия, грибы, кристаллы, мукус, сперматозоиды, артефакты.

Производительность: 60 образцов в час. Взятие образца: автоматическое; штатив с пробирками; перемешивание образца. Объем образца: минимальный объем нецентрифугированной мочи 4 мл; объем взятия 1 мл.

АВТОМАТИЧЕСКИЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР BIOLIT - 8020

120 реакционных кювет с возможностью повторного применения и функций автоматической очистки. Автоматическая детекция уровня жидкости, защита от повреждения при вертикальном и горизонтальном движе-

нии. 200 тестов в час. Объем памяти: 1200 тестов.

Методы измерения: по конечной точке, кинетика, кинетика с фиксированным временем. Принцип отражательного фотометра. Источник света: галогенная лампа 12V/35W. Диапазон фотометра -0,1 ~ 4,0 Abs. Отчетливость фотометра: 0,0001 Abs.

Длины волн: 8, от 340 до 800 нм. Карусель реагентов: 30 мест. Карусель образцов: 45 мест. Реакционные кюветы: 120 шт. Расход дистиллированной воды: 2 л/час. Комплект очистки: 8-шаговая автоматическая очистка с 5 пробозаборников. Калибровка: линейность/нелинейность; многостантарный анализ. Контроль качества: 3 уровня QC, оценка и печать диаграмм анализов QC. Контроль температуры: термостат 37 град. С +/- 0,1 град.

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР HEMALIT - 3300

Возможность подключения к другим анализаторам

Точный результат

Особая функция очистки измерительного канала

Эргономичный интерфейс, комбинационность компьютера и кнопок на лицевой стороне прибора

Высокий уровень автоматизации

Характеристики

Определяемые параметры: WBC, LY#, MO#, GR#, LY%, MO%, GR%, RBC, HGB, HCT, MCH, MCHC, RDW-CV, RDW-SD, PLT, MPV, PDW, PCT. Дифференцировка лейкоцитов по трем популяциям.

19 параметров и 3 гистограммы.

Объем пробы: 18 мкл цельной крови, 20 мкл разбавленной крови

Производительность: 60 проб в час

Емкость хранения данных: минимум 10 миллионов результатов с гистограммами

Дисплей: жидкокристаллический дисплей, размер 14;

Габариты: 460мм*300мм*420мм

Масса: 24 кг

Питание: AC 100V- 240V, 50/60 Hz

Интерфейс связи: RS232 , LAN, USB, быстрые клавиши на лицевой стороне анализатора, стандартная мышка и клавиатура, встроенный принтер, внешний принтер.

ДОЗАТОРЫ ЭКРОС И ЭКОХИМ

Дозаторы пипеточные предназначены для объемного дозирования проб биологических жидкостей и реактивов, применяемых в практике медицинских и химических исследований с использованием одноразовых наконечников.

Небольшой вес дозатора позволяет снизить постоянное напряжение на кисть руки в процессе работы лаборанта; идеальная форма корпуса помогает дозировать жидкость в глубокие узкие сосуды; функциональность и простота в обращении создают возможность самостоятельно откалибровывать дозаторы; конус-держатель в многоканальных дозаторах легко вращается на 360 градусов; наконечники легко устанавливаются и сбрасываются; дозаторы калибруются на заводе изготовителе в соответствии со стандартом ISO 8655; калибровочный сертификат прилагается к каждому дозатору.

ДОЗАТОРЫ ПЕРЕМЕННОГО ОБЪЕМА SOCOREX

Компания Socorex из Швейцарии создала инновационные дозаторы, груши и наконечники, кардинально изменившие работу лаборанта в лучшую сторону. Новая линия автоматических пипеток **ACURA MANUAL 825 и 826** была создана с тем самым вниманием и заботой, которые и делают бренд Socorex таким знаменитым на протяжении уже нескольких поколений инструментов.

Особенности:

- эргономичный дизайн;
- удобная форма, легкий вес и сверхмягкий ход поршня;
- удобное расположение цифрового окна на корпусе пипетки. Одно нажатие кнопки переключит дисплей для просмотра с левой или с правой стороны;
- инновационная система сброса наконечников;
- простая и высокоточная система пользовательской калибровки Swift-set;
- переменная рабочая скорость. Благодаря специальному селектору можно настраивать скорость набора жидкости;
- инновационная система Justip позволяет регулировать высоту эжектора;
- автоклавирование при 121°С;
- модель 825 включает в себя 8 видов пипеток, работающих в диапазоне от 0,1 до 1000 мкл

Возможны следующие режимы работы пипетки:

- прямое пипетирование;
- обратное пипетирование;
- шаговое пипетирование;
- разведение;
- смешивание жидкостей (до 3 различных жидкостей в одном наконечнике).

Специальные возможности: удобное размещение батарей; питание пипетки осуществляется от NiMH батареи, расположенной в рукоятке инструмента.

Модель Acura Electro 935 Macro снабжена защитными фильтрами из целлюлозы или полипропиленового волокна, которые устанавливаются на носик пипетки. Электронные пипетки работают в диапазоне от 0,1 до 350 мкл. Экономия времени на обслуживании. Конструкция пипетки Acura electro сводит обслуживание к минимуму и не требует инструментов для разборки.

Дополнительные возможности: использование специального переходника позволяет работать не только с полипропиленовыми наконечниками, но и со стеклянными пастеровскими пипетками объемом 5 мл.

Базовая комплектация Acura electro включает саму пипетку, инструкцию к ней, сертификат, зарядную стойку, блок питания, дополнительные батареи и образцы наконечников

Наконечники для дозаторов. Линия наконечников

изготовлена исключительно из высококачественного, стерильного полипропилена, без добавления металла. Точность и отсутствие шва достигается благодаря изготовлению под давлением воздуха.

Преимущества наконечников Socorex:

- широкий выбор, высокое качество
- россыпью (1000) или в стойке (10x96)
- регулируемый переменный объем
- совместимость с различными марками пипеток
- высокая плотность фильтра предотвращает аэрозольное загрязнение
- наконечники с фильтрами без ДНК и РНК
- наконечник с апирогенным стерильным фильтром
- совместимость с дозаторами таких брендов, как Brand, Biohit, Eppendorf, Finnpipette, Gilson.

Дозаторы и груши Socorex позволяют не только отдохнуть вашим рукам, но и заботятся о чистоте вашего рабочего пространства!

Журнал **«ГЛАВНЫЙ ВРАЧ»** дает ответы, необходимые для принятия эффективных решений в сфере управления здравоохранением

ТОО "МедМедиа Казахстан", г. Алматы, ул. Дуйсенова, 25
тел.: + 7 (727) **330 29 00, 317 10 00**

ГИПОТЕЗЫ О РОЛИ МИТОХОНДРИИ В РАЗВИТИИ И РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В НОРМЕ, ПРИ КЛЕТОЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ И РЕВЕРСИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Б.И. Исмаилов, С.Б. Исмаилов

КазНИИ онкологии и радиологии МЗ РК, г. Алматы

Аннотация

Изменения состояния количественно-качественных параметров митохондрии клеток предложено рассматривать как действенный механизм регуляции в них уровня пероксигеназного стресса – содержания активных форм кислорода и перекисных продуктов. Некоторые из этих агентов как сигнальные молекулы прямо или опосредованно модифицируют регуляторные и синтетические процессы в клетке, влияя тем самым на ее пролиферацию и дифференцировку и другие фундаментальные процессы. Аргументирована связь смены состояния клеток, в том числе эмбриональных и стволовых, от нормального до различных патологических форм со степенью возрастания в них дисбаланса между его прооксидантными и антиоксидантными составляющими. Впервые выдвинуто представление о том, что одним из необходимых условий для обратного развития клеток, в частности опухолевых, должно быть и действительно является снижение в них указанного дисбаланса до определенных уровней под влиянием различных индукторов реверсии. С «митохондриальных» позиций изложены также суждения о причинах относительной легкости малигнизации эмбриональных и стволовых клеток и обратной их нормализации.

Change the status of recognized quality of mitochondria cells suggested as an effective mechanism for regulating the level of peroksigenaznogo stress-content oxygen and peroxides. Some of these agents as signaling molecules directly or indirectly modify the regulatory and synthetic processes in the cell, thereby impacting on the proliferation and differentiation, and other fundamental processes. Change of status cells argued relationship, including embryonic and stem, from normal to various pathological forms of degree increase in the imbalance between the prooksidantnymi and antioxidant ingredients. For the first time put forward the idea that a necessary condition for reverse development cells, particularly cancer, should be and indeed is the reduction of the imbalance before certain levels under the influence of various inducers of reversion. «MtDNA» positions are also judgements about the reasons for the relative ease with which malignizacii embryonic and stem cells and reverse their normalization.

Ключевые слова: митохондрии, окислительный стресс, стволовые и опухолевые клетки, дисбаланс, реверсия.

Введение: исходные факты и положения

При обсуждении обозначенной нами темы непременно возникает вопрос: каковы же первичные, объективные и эволюционно обусловленные причины, причастные к реализации фундаментальных нормальных и патологических процессов в клетке, в частности, пролиферации (окислительного митогенеза), дифференцировки, апоптоза, старения и связанных с ним возрастных патологий? Ответ на этот вопрос будет предопределять основы той теоретической концепции, которая может привести к пониманию указанных столь разных биологических феноменов с каких-то единых позиций. Размышления в этом направлении привели нас в свое время **[1].** к мнению, что основным естественным первичным фактором, индуцирующим названные процессы, является окислительный стресс разного уровня. Он возникает обычно при избыточном содержании в клетках свободного кислорода (O_2) и его активных форм (ROS). Тогда возникает, естественно, другой вопрос: почему и как создается эта избыточность?

Исходным фактом здесь для логики развития наших представлений стала относительная гипероксичность земной атмосферы. Как известно, жизнь на Земле зарождалась в отсутствие в ее первичной атмосфере свободного O_2. С течением времени в результате возникновения начальных анаэробных форм жизни состав атмосферы постепенно изменялся: в ней все более возрастало содержание O_2 и она начала приобретать окислительные свойства. Позднее этот процесс интенсифицировался, особенно в эпоху бурного развития фотосинтезирующих организмов. Между тем, свободный избыточный O_2, похоже, изначально стал дестабилизирующим, деструктивным фактором по отношению к самым различным органическим и неорганическим образованиям на Земле. Биологическая эволюция вынуждена была учитывать указанное «кислородное» обстоятельство путем постоянной адаптации одно- и многоклеточных организмов к негативному действию O_2.

Адаптация происходила сразу в нескольких направлениях. Вместе они привели к образованию в организме различных антиоксидантных систем. При этом «адаптивные решения» природы возникали, очевидно, дискретно в ответ на определенные «чувствительные» величины приращений концентрации O_2 и парциального его давления (pO_2) в атмосфере. В результате на определенных этапах биологической эволюции отбирались необходимые для того времени антиоксидантные соединения и процессы. Они были адекватны соответствующим дискретным диапазонам дисбалансов Δ(PO-AO) между их прооксидантными (PO) и антиоксидантными (AO) составляющими (см. ниже).

В клетке, например, такая система является иерархической и представлена не менее чем, 3 уровнями (ступенями) защиты **[1; 2; 3].** Первый и наиболее эффективный уровень антиоксидантной системы реализован в виде митохондриального дыхания. Механизм этого «изобре-

тения» природы приспособлен для выполнения нескольких функций. Одна из них связана с утилизацией митохондриями до 95-99 % поступившего в нее кислорода и в этом смысле является антикислородной. Митохондриальное дыхание обеспечивает в клетке низкий, но достаточный для дыхания и энергообеспечения уровень pO_2.

Одновременно с появлением того же механизма стала реальной перспектива энергетического и субстратного обеспечения многих новых формирующихся в ходе эволюции физиологических функций — клеточных, органных и организменных. Низкое внутриклеточное pO_2 соответствует физиологическим условиям. При нем протекание перекисного окисления в ограниченных масштабах сопряжено с нормальными метаболическими процессами в клетке и выполнением им определенных полезных функций. В этих условиях катастрофические, разрушительные для клеток последствия исключены, если к тому же действуют и другие защитные линии антиоксидантной системы. Однако антикислородная линия защиты не способна, по-видимому, полностью предотвратить возможные негативные последствия избыточного образования ROS и усиления, в частности, перекисного окисления липидов (LPO). Это связано с образованием необходимых для LPO, ROS и в процессах нормального метаболизма.

Второй ступенью антиоксидантной системы в клетке является антирадикальная. Она предназначена для инактивации различных ROS (свободных радикалов и нерадикальных форм реактивного O_2). Третья ступень защиты – антиперекисная. На ней образовавшиеся перекиси разрушаются соответствующими ферментами или же в результате реакций их взаимодействия с определенными соединениями.

В указанной антиоксидантной системе вклад отдельных механизмов защиты неодинаков. Решающую роль в ней играет антикислородная ступень. Она наиболее резко ограничивает «мощность» пероксигеназных процессов и область их проявления. Исправное действие этой линии защиты предопределяет надежную работу последующих более «тонких» ступеней, которые рассчитаны на нейтрализацию свободных радикалов и перекисей в достаточно узких пределах их изменения. В случае же дефектности антикислородной (митохондриальной) линии защиты «антикислородное поведение» митохондрий оборачивается прямо противоположным эффектом – очевидной гипероксией вследствие слабой утилизации O_2. Недостаточность митохондриального дыхания объективно становится ключевым фактором в создании пероксигеназного стресса сначала в митохондриях, а затем в цитоплазме и в клетке в целом. Это ведет к развитию в ней различных дестабилизирующих процессов. К тому же, становятся неэффективными вторая и третья ступени защиты. Они в этом случае просто не справляются с большим потоком свободных радикалов и перекисей [1, 3].

Все указанные выше сдвиги ускоряются различными внешними воздействиями (радиация, химические агенты, тепло, прооксиданты и др.), прямо или косвенно нарушающими митохондриальное дыхание и усиливающими в клетке окислительный стресс. Полной нейтрализации антиоксидантной системой дисбаланса Δ(PO-AO) не происходит и, по-видимому, не может (не должно) произойти. «Зазор» между его PO- и AO-составляющими продолжает существовать. Он постоянно травмирует, прежде всего, все те же чувствительные к окислительным повреждениям митохондрии. В таких клетках уровни pO_2, ROS и Δ(PO-AO) постепенно повышаются. Возникающий при этом пероксигеназный стресс становится объективной первопричиной нормального клеточного старения, возрастных патологий, в том числе атеросклероза, сахарного диабета, болезни Альцгеймера и спонтанного канцерогенеза. При более заметном возрастании Δ(PO-AO) реализуются апоптоз и окислительный цитолиз. В наших работах под составляющими PO и AO дисбалансов Δ(PO-AO) понимаются некие интегральные «проколичественные» показатели. Таковыми, скорее всего, являются стационарные уровни прооксидантов и антиоксидантов и/или уровни их продукции на момент участия их в индукции процессов пролиферации дифференцировки, старения, канцерогенеза и апоптоза.

Анализ и обобщение многих известных фактов позволило нам с учетом указанных выше исходных «эволюционных» положений сформулировать ряд приоритетных гипотез в области биологии и связанных с ней медицинских проблем.

***Гипотеза* 1. Возникновение в ходе эволюции и проявление в клетках последовательности «специализированных» дисбалансов δ(ро-ао).**

Указана возможность градации дисбалансов Δ(PO-AO) с выделением при этом, по меньшей мере, 7 условных диапазонов их значений, которым соответствуют и/или от которых зависит конкретное состояние клетки. В пределах дисбалансов Δ_I(PO-AO), Δ_P(PO-AO) и Δ_C(PO-AO) реализуются соответственно интерфазная часть клеточного цикла (и, вероятно, состояние покоя), пролиферация (окислительный митогенез нормальной, неопухолевой клетки) и канцерогенез; при дисбалансе Δ_{Cy}(PO-AO) происходит цитолиз клетки, а в диапазоне дисбалансов Δ_{A1}(PO-AO) и Δ_{A2}(PO-AO) – апоптозы соответственно типа A1 и A2. Таким образом, с каждым из «специализированных» дисбалансов Δ(PO-AO) увязаны допустимость и даже необходимость реализации определенного комплекса биохимических процессов. В сокращенном обозначении указанные дисбалансы располагаются в последовательности:

$$\Delta_I < \Delta_P < \Delta_{A1} < \Delta_C < \Delta_{A2} < \Delta_{Cy} \qquad (a)$$

Старение клеток происходит, вероятнее всего, в диапазоне дисбалансов Δ_{Ag}(PO-AO), который расположен между дисбалансами Δ_P и Δ_{A1}. Тогда, после дополнения, последовательность (a) примет вид:

$$\Delta_I < \Delta_P < \Delta_{Ag} < \Delta_{A1} < \Delta_C < \Delta_{A2} < \Delta_{Cy} \qquad (b)$$

В обоснование и с учетом неравенств (b) нами были сформулированы общие положения кислородно-перекисной концепции развития, старения, возрастных патологий, канцерогенеза и программированной смерти клеток **[3, 4].**

Как отмечалось выше, от количественно-качественных параметров митохондрий существенно зависят интенсивность утилизации ими поступившего в клетку O_2 и, соответственно, уровни в ней pO_2, ROS и дисбаланса Δ(PO-AO). Это касается и Δ_P(PO-AO), причастного к индукции процесса пролиферации (окислительного митогенеза). Общее содержание ROS на этом нормально контролируемом этапе развития складывается из ROS, образующихся как при исправном функционировании дыхательной цепи, так и определяющихся непосредственно уровнем внутриклеточного pO_2. Значения дисбалансов не выше диапазона Δ_P(PO-AO) определяются, в

основном, работой полностью исправных митохондрий. В этом смысле они являются «нормальными, непатологическими» дисбалансами.

Возникновение же всех других «специализированных» диапазонов дисбалансов Δ(PO-AO), которые превосходят по значению Δ_P(PO-AO) в последовательности (b), так или иначе связано с дефектами в митохондриях. В таких случаях общая интенсивность митохондриального дыхания заметно снижается. Это повышает уровни pO_2, ROS и продуктов пероксигенации сначала в самих митохондриях, а затем в цитоплазме и во всей клетке. В зависимости от степени этих изменений окислительный стресс в клетке принимает значения, которые индуцируют старение, апоптоз, злокачественную трансформацию или окислительный цитолиз клетки. Таким образом, дисбалансы Δ_{Ag}, Δ_{A1}, Δ_C, Δ_{A2} и Δ_{Cy} являются следствием, в основном, разной степени патологии множества митохондрий. В этих случаях они уже не способны эффективно выполнять антикислородную функцию в составе антиоксидантной системы защиты в клетке. Эти «патологические» дисбалансы приводят к негативным для организма последствиям. Исключение составляют дисбалансы Δ_{A1} и Δ_{A2}.. Они адаптированы эволюцией для выполнения в целом позитивных функций – поддержания тканевого гомеостаза путем устранения дефектных и ставших ненужными клеток.

Обратим здесь внимание на весьма вероятную связь возникновения «канцерогенезного» дисбаланса Δ_C с сообщениями о том, что опухолевые (раковые) клетки имеют стволовоклеточное происхождение [5, 6-8, 9]. Такие факты, ввиду принципиально важной их значимости, требуют специального рассмотрения. Пока же уместным кажется следующее наше краткое суждение по данному вопросу.

Субпопуляции клеток со свойствами раковых стволовых клеток обнаруживаются практически во всех исследованных типах неоплазм человека и животных. Об этом свидетельствуют также многочисленные публикации, особенно в последние годы. Такие стволовые клетки найдены, в частности, в глиобластоме [10; 11], гепатоме [12; 13], плоскоклеточном раке головы и шеи [14], при лейкозе [15;16], в раке молочной железы [17; 18], в опухоли головного мозга [19], в раке кишечника [20; 21], почки [22], кожи [23], простаты [24], легких [25], поджелудочной железы [26; 27], раке яичника [28], нейробластоме [29] и во многих других опухолях. Эти внушительные данные фактически подтверждают мнение теперь уже значительной части исследователей о том, что нормальные стволовые клетки, обитающие в разных органах и тканях, спонтанно или при воздействии на них различных индукторов канцерогенеза закономерно трансформируются в опухолевые стволовые клетки [30-37]. Именно поэтому последние присутствуют во многих злокачественных опухолях, играют центральную роль в их образовании и формировании всех характерных свойств неоплазм [38; 39].

Согласно концепции раковых стволовых клеток [38; 39]. в организме животных и человека злокачественной трансформации в первую очередь подвергаются тканеспецифические стволовые клетки. Они обычно отличаются малым содержанием митохондрий или их неразвитостью [40]. Например, мелкие овальные клетки из печени крыс (печеночные стволовые клетки) отличаются высоким ядерно-цитоплазматическим отношением и содержанием всего нескольких митохондрий и других органелл [41]. В гемопоэтических стволовых клетках низкое количество соединений, образующих дыхательную цепь в митохондриях, коррелирует со слабым уровнем потребления ими O_2 [42]. Действительно, при указанной слабой митохондриальной базе интенсивность утилизации O_2 в таких клетках недостаточна для поддержания в них низких уровней pO_2 и дисбаланса Δ(PO-AO). Поэтому стволовые клетки отличаются повышенной чувствительностью к радиации и другим воздействиям, усугубляющим кислородно-перекисную ситуацию. В таких клетках создаются необходимые условия для возрастания в части гетерогенных по составу стволовых клеток дисбаланса Δ_P сразу до уровня Δ_C и повышенная внутриклеточная гипероксия индуцирует нестабильность генома (мутабильность), трансформацию нормальных стволовых клеток и развитие из них первичных опухолевых клеток.

Указанные события более характерны для стволовых клеток молодых организмов. В тканях же взрослых организмов злокачественному перерождению подвергаются и некоторые тоже гетерогенные по составу старые клетки. В них, как известно, уровни окислительного стресса и дисбаланса Δ(PO–AO) повышены. Это облегчает их переход в «канцерогенезный» диапазон Δ_C и объясняет факты частой приуроченности канцерогенеза к пожилому возрасту [3].

Кроме указанных масштабных способов влияния на уровень окислительного стресса, в митохондриях функционируют и более «тонкие» механизмы регуляции кислородно-перекисного состояния. Привлекает внимание, например, факт установления специфичного для митохондрий гена тиоредоксина-2. Он входит в систему защитных механизмов клетки и при окислительном стрессе активность его повышается [43]. Т-лимфоциты, трансфицированные геном тиоредоксина, усиливали его секрецию под действием H_2O_2. Предобработка клеток тиоредоксином дозозависимо подавляла эту секрецию и образование в клетках ROS [44]. В указанных случаях тиоредоксин как антиоксидант действует в составе системы регуляции с отрицательной обратной связью по поддержанию (ограничению) окислительного стресса в митохондриях на определенном уровне. Примечательно также, что ROS-зависимая активация ядерного фактора NF-*k*B, обнаруженного и в митохондриях [45], повышает содержание антиоксидантных ферментов тиоредоксина и марганецсодержащей супероксиддисмутазы (MnSOD) в клетках саркомы Ewing. Это приводит к защите их от вызванного фактором TNF-*α* апоптотического окислительного стресса [46]. Кстати, отрицательная обратная связь здесь может осуществляться и по другому механизму. В ответ на накопление продуктов одноэлектронного восстановления O_2 поры во внутренней митохондриальной мембране способны открываться. Это приводит к утечке протонов, стимуляции дыхания и снижению концентрации O_2, что, в свою очередь, уменьшает скорость образования ROS и устраняет причину открывания пор [47].

Следует иметь в виду, что в клетке, вне митохондрий, окислительный стресс поддерживают и даже усиливают и другие источники ROS. К ним относятся реакции гидроксилирования цитохромами P-450; реакции, катализируемые NADPH-оксидазой и ксантиноксидазой; реакции окисления арахидоновой кислоты, катализируемые липо-и циклооксигеназами и др. [48].

***Гипотеза 2.* Изменение количественно-качественных параметров митохондрий как действенный механизм регуляции уровня окислительного стресса (содержания ros, продуктов перекисного окисления) и зависимых от него нормальных и патологических процессов в клетке.**

Как известно, состояние биоэнергетики во всех эукариотических клетках определяется функционированием в них митохондрий. Оно прямо или косвенно влияет на все внутриклеточные процессы. Это влияние обычно связывают с продукцией ATP в ходе реализуемого в митохондриях окислительного фосфорилирования. Однако анализ результатов современных исследований показывает, что воздействие митохондрий на многие процессы может вызываться и опосредованно самой их способностью просто быть главным потребителем поступившего в клетку свободного O_2. Данная функция митохондрий позволяет поддерживать достаточно низкие внутриклеточные значения pO_2 и непосредственно связанные с ними уровни ROS и перекисных продуктов [1-3, 46]. Эти агенты в определенных диапазонах их значений играют роль сигнальных молекул [47-49 и др.].

Согласно указанной логике, изменение мощности митохондриальной базы (количества и качества митохондрий), как бы оно ни происходило, служит фактически способом регулирования в клетке кислородно-перекисного состояния (уровня окислительного стресса). Соответственно управляются и зависимые от него сигнальные пути, влияющие на ход всех фундаментальных клеточных процессов. В такой постановке этот, с нашей точки зрения, принципиально важный регуляторный канал до сих пор не являлся предметом должного исследования и обсуждения в научной литературе. По-видимому, «кислородно-перекисные» сдвиги при указанной регуляции, на первый взгляд, побочные и малозначащие, не оказались привлекательными для биокибернетиков и специалистов в области физико-химической биологии клетки.

Названная выше «кислородно-перекисная» регуляторная функция митохондрий закономерно проявляется при реализации, в частности, следующего известного феномена: количество и степень зрелости (дифференцированности) митохондрий влияют на обратную зависимость пролиферации и дифференцировки нормальных клеток. Это происходит через изменение в них, как мы полагаем, уровня окислительного стресса.

По неоднократным публикациям прошлых лет, увеличение концентрации митохондриального материала является необходимым условием для смещения баланса между процессами дифференцировки и пролиферации в сторону дифференцировки. Это касается и трансформированных клеток. Например, в линии QM7 миобластов перепела угнетение трансляции в митохондриях хлорамфениколом блокирует дифференцировку; такое же действие оказывал олигомицин, но данный эффект не связан с изменением жизнеспособности клеток. Стимуляция же активности митохондрий усиливала дифференцировку миобластов [50]. Интересное развитие зависимого от митохондрий соотношения пролиферации и дифференцировки отражено в работе **[51].** Авторы ее начали с того, что обратили внимание на характерную для эмбриональных и стволовых клеток особенность – низкое содержание в них митохондрий. Впоследствии количество этих органелл удваивается за каждый клеточный цикл. Увеличение числа митохондрий положительно влияет на процесс клеточной дифференцировки. С ее помощью частично осуществляется контроль над пролиферацией клеток. Мутации в ядерных генах, кодирующих митохондриальные белки, приводят к тому, что клетка не вступает в дифференцировку и способна стать опухолевой.

Сходная информация содержится и в ряде последующих публикаций. Так, недифференцированные эмбриональные стволовые клетки человека (ЭСКЧ) имеют всего несколько митохондрий. Они поляризуются (скапливаются) к одному краю клетки, а затем, по ходу ранней дифференцировки in vitro в кардиомиоциты, биполяризуются. Показано, что конечное поведение указанных ЭСКЧ связано с пролиферацией митохондрий и транскрипцией мтДНК, а биогенез митохондрий является ключевым событием в клеточной дифференцировке [52] В другой работе [53] описаны морфологические отличия между недифференцированными и дифференцированными ЭСКЧ линий SNUhES1, SNUhES2 и SNUhES3. Первые имеют высокое ядерно-цитоплазматическое отношение, нечеткие клеточные мембраны и мелкие митохондрии с малым числом крист; для вторых же характерны высоко развитые клеточные органеллы, в частности, эндоплазматический ретикулум, усеянный рибосомами, и большие митохондрии. Существенно, что дедифференцированные клетки тоже содержат такие примитивные органеллы как свободные рибосомы и полирибосомы, очень малое количество митохондрий, которые характеризуют незрелое состояние клеток после дедифференцировки [54].

Как представляется нам, усиление митохондриального дыхания (за счёт увеличения числа митохондрий и/или степени их созревания) при дифференцировке клеток не допускает на этот период повышение внутриклеточных уровней pO_2, LPO и дисбаланса Δ(PO-AO) до необходимых для окислительного митогенеза. При этом одновременно обеспечиваются низкая концентрация промитогенного циклического гуанозинмонофосфата, высокие уровни ATP и циклического аденозинмонофосфата (cAMP). Реализуются многие зависимые от cAMP антипролиферативные и продифференцировочные эффекты [3].

Примечательно, что присущая клеткам относительно «мягкая», неантагонистичная обратная зависимость между степенью дифференцировки и способностью их к пролиферации обнаружена также у самих митохондрий, существовавшим когда-то в виде независимых микроорганизмов. Эта фундаментальная связь давно уже зафиксирована, например, в ооцитах вьюна. Локализованные в их периферийной зоне крупные с развитыми кристами митохондрии хорошо дифференцированы и в значительной мере утеряли способность к росту и делению. Более же мелкие с меньшим количеством крист околоядерные митохондрии дифференцированы слабо, но зато могут интенсивно расти и делиться [55].

Во взаимоотношениях митохондрий и содержащих их клеток важно иметь в виду следующее. В активно растущих еще недифференцированных клетках митохондрии тоже недоразвиты, слабо дифференцированы и, наоборот, во взрослых уже специализированных клетках митохондрии обычно хорошо дифференцированы [53, 55]. Диффренцировочные и количественные изменения происходят сначала в самих митохондриях и лишь затем в содержащих их клетках. Управляющая роль митохондрий в клеточной дифференцировке имеет место как в нормальных, так и патологически измененных клетках. У первых эти органеллы функционируют как вполне исправные, а у вторых – как в той иной степени дефектные. В обоих случаях указанная роль митохондрий сводится, очевидно, к заметному изменению ими в клетке кислородно-перекисного состояния — уровней pO_2, ROS и дисбаланса Δ(PO – AO). Эти параметры, в свою очередь, как сигнальные факторы в определенных пределах их значений способны прямо или опосредованно влиять на регуляцию количества дыхательных ферментов [56], на иные

регуляторные и синтетические процессы, в том числе на пролиферацию (см. ниже).

Изложенные выше представления наиболее отчетливо должны проявляться во взаимоотношениях пролиферации и дифференцировки эмбриональных и стволовых клеток, поскольку у них, повторяем, содержится мало митохондрий или они мелкие и в какой-то степени недоразвиты [41, 42, 52, 53]. По причине того же дефицита митохондриального дыхания эти клетки на стадии повышенного уровня размножения, т.е. до дифференцировки, обладают высокой радиочувствительностью. Они же являются мишенью для действия различных прооксигеназных канцерогенных факторов, прежде всего радиационных. После определенного числа делений эмбриональных и стволовых клеток в них значительно возрастает количество митохондрий, после чего и происходит процесс дифференцировки самих этих клеток [40].

Отмеченная выше связь процессов пролиферации и дифференцировки нормальных клеток с состоянием их митохондриальной базы продолжает действовать и в опухолевых клетках. В этом отношении примечателен следующий факт. Чувствительные к холоду линии мутантных клеток (выделены из недифференцированной мастоцитомы мыши) при переносе из «допускающей» температуры 39,5°С в «недопускающую» температуру 33°С прекращали деление и претерпевали морфологическую дифференцировку. Смена температуры вызывала временное увеличение содержания цитохром-*c*-оксидазы и ДНК-полимеразы γ, утроения за 6 суток числа митохондрий в клетке и удвоения отношения общего объёма митохондрий к объёму клетки. Пролиферация митохондрий здесь признана обязательным шагом при морфологической дифференцировке клеток мастоцитомы [57]. Объяснение этого феномена нам видится в значительном усилении в указанных опухолевых клетках суммарной интенсивности митохондриального дыхания, снижении или устранении «канцерогенезного» дисбаланса Δ_K(PO-AO).

***Гипотеза* 3.Повышение мощности и активности митохондриального дыхания может, в зависимости от степени снижения дисбаланса δ(po-ao), вызывать обратное развитие (реверсию) клетки в одно из предшествующих ее «специализированных» состояний.**

Это положение предполагает, что первичные регуляторные и синтетические изменения в клетке вследствие возрастания в ней уровня окислительного стресса и перехода ее из одного состояния в другое в соответствии с неравенствами (b) происходит, в основном, по эпигенетическому механизму. Поэтому в опухолевой клетке при снижении в ней дисбаланса Δ_C(PO-AO) до ближайшего к нему диапазона Δ_{A1}(PO-AO) будет индуцироваться апоптоз А1 за счет действующих в этом диапазоне сигнальных молекул (ROS, некоторых перекисных продуктов). Фактов такого рода сейчас известно много [3, 4, 57, 58]. При более заметном снижении дисбаланса Δ_C(PO-AO), например, до уровня Δ_{Ag}(PO-AO), возможен возврат опухолевой клетки в состояние старения. Здесь, к сожалению, мы можем сослаться лишь на одну известную нам работу [59]. В ней сообщается, что ретиноиды могут остановить рост опухоли (карциномы молочной железы и клеток нейробластомы) путем запуска программы старения, но не дифференцировки. Не исключено, что указанный эффект ретиноидов связан с их антиоксидантным действием, так как двойные ненасыщенные связи в их молекулах могут депонировать свободный O_2.

Но наиболее интересными представляются известные в литературе факты спонтанной и индуцированной нормализации опухолевых клеток [60-62 и др.]. Этот феномен мы связываем с тем, что повышенный в них дисбаланс Δ_K(PO-AO), обусловленный недостаточностью (дефектностью) митохондрий [1-3], так или иначе снижается до уровня Δ_P(PO-AO) и ниже. В доступной нам литературе эта тема затрагивается лишь в единичных работах. Например, восстановление в раковых клеточных линиях (MCF-7 и др.) митохондриального антиоксиданта MnSOD ведет к реверсии злокачественности. Сигнальные пути фенотипических изменений в сверхэкспрессирующих MnSOD клетках неизвестны. Однако отмечались изменения нескольких редокс-чувствительных факторов транскрипции, включая AP-1 и NF-*k*B. Авторы данного исследования [4] заключают, что восстановление и сверхэкспрессия MnSOD в опухолевых клетках специфично модулирует экспрессию нисходящих эффекторных генов. На различных экспериментальных моделях показано, что инозитгексафосфат (IP6) уменьшает пролиферацию и повышает дифференцировку опухолевых клеток. В результате происходит реверсия их к нормальному фенотипу [64]. Такую способность IP6 естественно связать с его свойством быть эффективным природным антиоксидантом [65]. Ингибирование пролиферации и обращение злокачественного фенотипа отмечались также на примере опухолевых клеток MCF-7, если они стабильно экспрессировали каталазу человека[66] детоксифицирующую сильный прооксидант H_2O_2.

***Гипотеза* 4. Повышенные спонтанная и индуцированная малигнизируемость эмбриональных и стволовых клеток, а также их обратная ревертируемость в нормальное состояние определяются преимущественно малым числом митохондрий и/или их дефектностью и соответственно изначально повышенным уровнем в указанных клетках «пролиферативного» дисбаланса Δ_P(po-ao).**

В настоящее время повышенное внимание исследователей обращено на факты дифференцировки эмбриональных опухолевых, в частности карциномных, клеток в нормальные стволовые клетки раннего эмбриона [67]. В этой связи обратимся с другому известному феномену [59]: эмбриональные опухолевые клетки нормализуются более часто и относительно легко, по сравнению с клетками неэмбриональных опухолей. Данное положение мы попытались обосновать путем сравнения (с митохондриальных позиций) степени изменения кислородно-перекисных ситуаций в эмбриональных нормальной и опухолевой клетках с таковыми в неэмбриональных соответственно нормальной и опухолевой клетках. Предварительно ввели следующие обозначения:

ENC – эмбриональные нормальные клетки;
ETC – эмбриональные опухолевые клетки
NNC – неэмбриональные нормальные клетки;
NTC – неэмбриональные опухолевые клетки.

По нашим представлениям, в основе указанного различия находятся принципиально важные данные о количественно-качественном состоянии митохондрий и дыхательного процесса в соответствующих клетках. В эмбриональных и стволовых клетках, как отмечалось выше, содержание митохондрий низкое или они мелкие и недоразвитые. Под «низким» будем понимать наличие всего лишь нескольких единиц или десятков митохондрий. На таком количественно-качественном уровне митохондрии, утилизируя O_2, не смогут значительно снизить pO_2 в клет-

ке. Поэтому внутриклеточный уровень pO_2 и зависимые от него содержания ROS и перекисных продуктов будут достаточно высокими. Следовательно, в норме пролиферация (окислительный митогенез) эмбриональных клеток реализуется при повышенном, ближе к верхней границе диапазона дисбалансе $\Delta_{P,ENC}$(PO-AO). В неэмбриональных нормальных клетках содержание митохондрий высокое (сотни и тысячи). Например, в гепатоцитах их насчитывают несколько тысяч. В таких клетках потребление O_2 многочисленными митохондриями должно заметно снижать значение внутриклеточного pO_2 и связанный с ним дисбаланс $\Delta_{P,NNC}$(ПО-АО), приближая его к нижней границе этого диапазона, т.е. $\Delta_{P,ENC} > \Delta_{P,NNC}$.

Опухолевые клетки, в том числе и ETC, возникшие при участии «канцерогенезного» дисбаланса Δ_C(PO-AO), вследствие неполноценности всех или части митохондрий и недостаточности митохондриального дыхания потребляют меньше O_2. Это должно приводить к повышению в них pO_2, которое, естественно, зависит от общего количества митохондрий, особенно дефектных [3]. В ETC, где их мало, это повышение будет незначительным, по сравнению с многомитохондриальными NTC. У NTC снижение утилизации ими O_2 и соответственно повышение дисбаланса Δ_C должны быть более существенными, т.е. $\Delta_{C,ETC} < \Delta_{C,NTC}$.

По логике этих «митохондриальных» суждений (за отсутствием других более веских количественно-качественных доводов), вероятность реальности указанных неравенств достаточно высока. Выпишем их отдельно и вместе:

$$\Delta_{P,ENC} > \Delta_{P,NNC} \qquad (c)$$

$$\Delta_{C,ETC} < \Delta_{C,NTC} \qquad (d)$$

Поскольку согласно (a) всегда $\Delta_{C,ETC} > \Delta_{P,ENC}$ и $\Delta_{C,NTC} > \Delta_{P,NNC}$, то с учетом (c) и (d) можно записать разности:

$$(\Delta_{C,ETC} - \Delta_{P,ENC}) \text{ – относительно малая величина} \qquad (e)$$

$$(\Delta_{C,NTC} - \Delta_{P,NNC}) \text{ – относительно большая величина} \qquad (f)$$

Таким образом, чтобы ETC подверглись нормализации (перешли в состояние ENC), необходимо снизить в них дисбаланс лишь на небольшую величину (e); для перехода же NTC в нормальное состояние NNC придется снизить в них дисбаланс на более значительную величину (f). Это различие и объясняет, на наш взгляд, относительно легкую и частую спонтанную или индуцированную реверсию эмбриональных опухолевых клеток (по сравнению с неэбриональными опухолевыми клетками) при усилении в них действия, например, антиоксидантной системы. Наилучшего эффекта здесь следует ожидать при наращивании мощности самой митохондриальной базы. Он наиболее заметно ограничивает уровень окислительного стресса и область его проявления. Специально отметим, что из-за гетерогенности опухолевых клеток массовой реверсии их не может быть. Нормализуются, прежде всего, те из них, в которых дисбаланс Δ_C(PO – AO) в пределах этого «канцерогенезного» диапазона наиболее приближен к его нижней границе.

Заключение (выводы)

Основное внимание в данной статье уделено теоретическому рассмотрению того, каким образом митохондрии причастны и способствуют реализации таких известных феноменов как 1) обратная зависимость пролиферации и дифференцировки клеток, 2) относительно легкая и частая малигнизация эмбриональных и стволовых клеток, содержащих малое количество митохондрии, 3) реверсия таких клеток к нормальному фенотипу. Варьируя количество, размеры и степень зрелости (дифференцированности) митохондрий как основных потребителей поступившего в клетку O_2, природа одновременно «внедрила» эффективный механизм регуляции уровня окислительного стресса в самих митохондриях и в клетке в целом. Регуляция происходит за счет варьирования внутриклеточного pO_2, весьма чувствительного к изменению интенсивности митохондриального дыхания. Затем реализуется pO_2-зависимое «управление» количеством образующихся ROS и продуктов перекисного окисления.

До недавнего времени эта регуляторная функция митохондрий не привлекала должного внимания исследователей. Возможно, ими просто недооценивалась ее масштабная по важности и широте роль в реализации фундаментальных клеточных процессов в норме и при патологии. Однако ситуация изменилась в связи с получением многих фактов о выполнении ROS и некоторыми перекисными продуктами функции сигнальных молекул. Эти вещества прямо или косвенно участвуют в модификации экспрессии генов, в том числе протоонкогенов, изменении активности ряда белков-ферментов (онкобелков, оксидаз, циклинзависимых киназ, каспаз, протеинкиназ, эндонуклеаз, теломеразы и др.).

Активирующее же действие ROS на факторы транскрипции эукариотических организмов опосредовано редокс-чувствительными сигнальными системами. Эти системы состоят из многих элементов и имеют иерархическую организацию. В их состав входят «регуляторные GTPазы, фосфолипазы, протеинфосфатазы, cGMP-зависимые, фосфолипид-зависимые и MAP (Mitogen-Activated Proteins)-протеинкиназы» [48]. Под действием ROS происходят не только активация определенных факторов транскрипции, но и ингибирование некоторых из них. В результате изменяются экспрессия подчиненных им генов и соответственно спектр экспрессируемых белков.

Различные прооксиданты и антиоксиданты влияют на регуляторные и синтетические процессы, очевидно, через изменение ими уровня ROS и перекисных продуктов. Здесь вполне закономерными можно считать эффекты различных антиоксидантов при переводе ими окислительного стресса в опухолевых клетках на более низкие уровни. Например, противоопухолевое действие антиоксиданта кверцетина связывают с up-регуляцией им генов супрессоров опухолей и dawn-регуляцией онкогенов и генов клеточного цикла [68]. Такими же модуляторами экспрессии генов являются каротиноидны как мощные антиоксиданты [69]. [Изофлавины сои (генистеин и др.) как антиоксиданты ингибируют индуцированный канцерогенами рак у животных in vivo. Они же модулируют in vitro экспрессию генов, ответственных за клеточный цикл и апоптоз. Генистеин подавляет также активацию сигнальных путей NF-*k*B и Akt [70]. В этих примерах речь идет, вероятно, об индукции антиоксидантами апоптоза, который по нашей градации относится к типу A1. Ряд фактов такого рода приведен и в нашей недавней статье [57]. Данные об участии антиоксидантов в нормализации опухолевых клеток приведены в [63, 64].

Таким образом, через названные выше исполнительные звенья кислородно-перекисные сигнальные молекулы выполняют фактически ключевую управляющую функцию при реализации таких фундаментальных процессов как пролиферация, дифференцировка, старение и апоптоз клеток; они же причастны к различным клеточ-

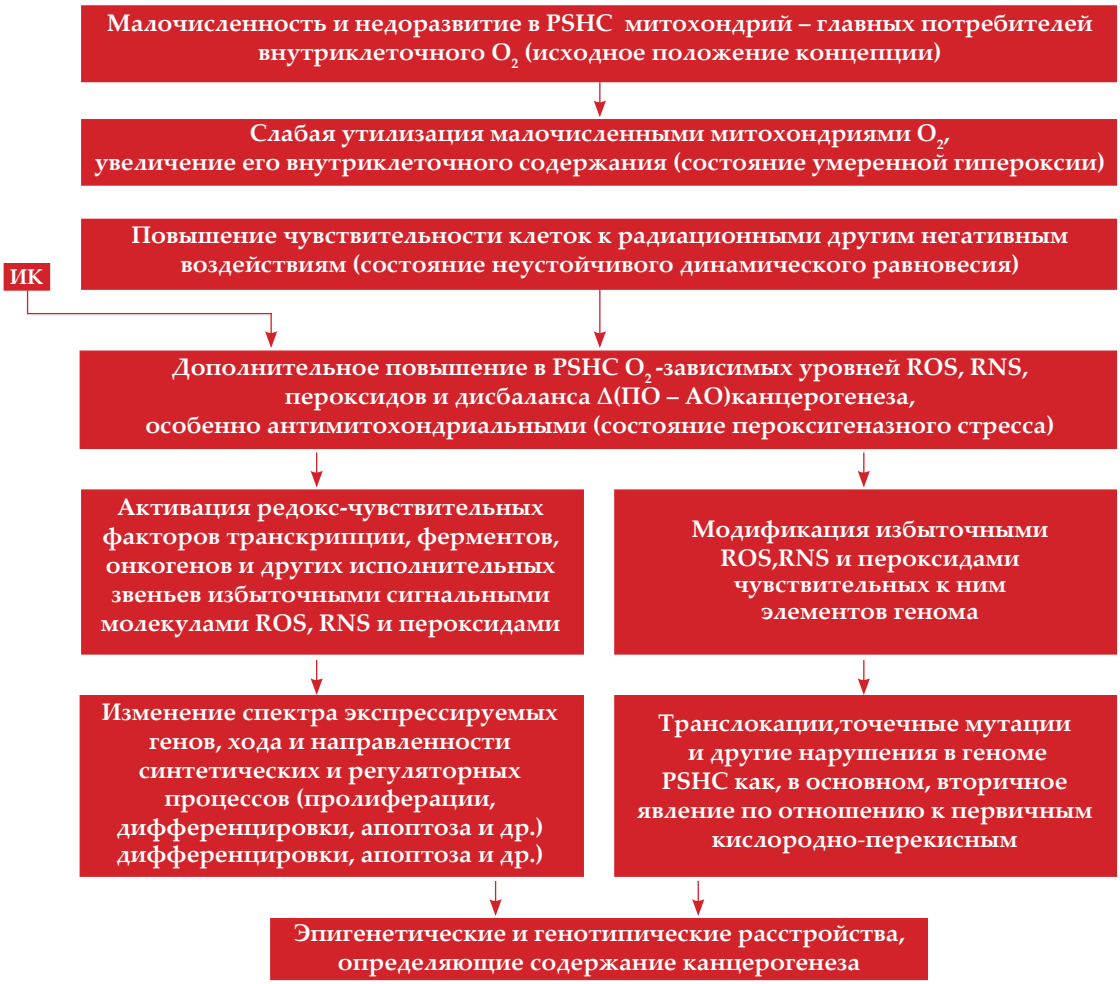
ным патологиям, в частности, к возрастным (атеросклерозу, сахарному диабету 2-го типа, болезни Альцгеймера), канцерогенезу и др. Однако тонкие «детали» механизма реализации этих процессов по сигналам из митохондрий и цитоплазмы остаются пока неразгаданными.

Указанные эффекты ROS и продуктов пероксигенации проявляются только в определенных пределах их концентрации. Это определяется действием в клетках закрепленной эволюцией последовательности «специализированных» диапазонов дисбалансов, которые связаны между собой в форме неравенств (b). Предположительно, многие внутриклеточные изменения в кислородно-перекисной ситуации носят эпигенетический характер. Поэтому допускается возможность обратного развития клеток (реверсии) при спонтанном или индуцированном извне снижении в них уровня дисбалансов Δ(РО–АО) до расположенного ниже «специализированного» диапазона. Это касается, в частности, и нормализации опухолевых клеток.

Наметившаяся тенденция к увеличению числа публикаций об ROS и пероксидах как сигнальных молекулах и зависимых от них регуляторных и синтетических процессах, вероятно, продолжится. Тогда, в дополнение к уже известным [48, 49, 50, 71, 72 и др.], должны быть обнаружены пока еще скрытые ROS- и пероксид-зависисые эффекты. Некоторые из них могут реализовываться как составные части глобальных процессов окислительного митогенеза, дифференцировки, старения, канцерогенеза и апоптоза, а также реверсии из некоторых этих состояний. Здесь важно знать и понимать, подчеркнем еще раз, что исполнительные звенья названных процессов могут приводиться в действие кислородно-перекисными сигнальными молекулами, уровень которых начинает определяться и контролироваться уже на стадии функционирования митохондрий путем регулирования их количества, структуры и активности. В этом видится своего рода стратегическая многоцелевая регуляторная роль митохондрий в динамике процессов размножения, специализации, старения и смерти клеток.

Ниже на рисунке-схеме приведена структурно-функциональная блок-схема выдвигаемой нами митохондриально-кислородно-перекисной концепции канцерогенеза.

Рисунок 1. Схема митохондриально-кислородно-перекисной концепции канцерогенеза. ИК–индукторы канцерогенеза (остальные обозначения см. в тексте).



Чтобы проверить правильность изложенных в данной статье положений и гипотез, необходимо, прежде всего, уметь «управлять» (стимулировать и, наоборот, замедлять) процессом биогенеза митохондрий в различных клетках. Можно прогнозировать, например, что увеличение числа митохондрий в опухолевой клетке придаст ей черты нормальной клетки, а снижение количества этих органелл приведет ее к апоптозу А2. Такие противоположно направленные регуляторные меры применительно к стволовой клетке должны индуцировать соответственно ее специализацию и апоптоз А1 (или даже канцерогенез).

ГЕМОГЛОБИНОВЫЙ ТЕСТ: НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ

Н.Р. Аблаев

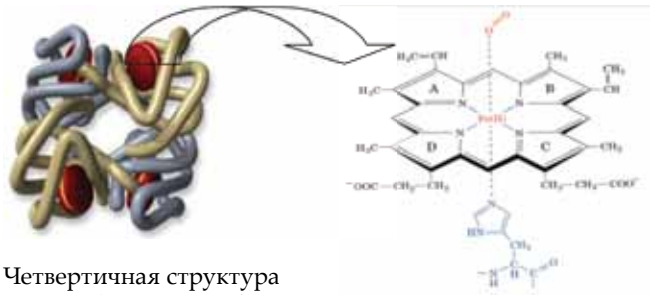
д.м.н., профессор, кафедра лабораторной диагностики и молекулярной медицины КазНМУ им. Асфендиярова г. Алматы

Hemoglobin test - one of the the most important test on saturation organ and fabric oxygen, without which slam on the brakes or completely stop the chemical processes, delivering sufficient amount ATP, playing role universal energy currency. At disease in red blood cells can be kept such types of the haemoglobin, which not capable execute respiratory function. The most using in clinical laboratory method does not allow adequately to judge these «pathological» derived hemoglobin about level

Гемоглобин – одна из важнейших молекул в нашем организме. Это – основной дыхательный пигмент и главный компонент эритроцитов, выполняющий незаменимые функции в организме человека: кроме переноса кислорода из легких в ткани и углекис лого газа из тканей в легкие, и очень важная регуляция кислотно-основного состояния крови тоже осуществляется гемоглобином. Буферная система, создаваемая гемоглоби ном (Hb), способствует сохранению pH крови в определенных физиологических пределах.

Химическая природа гемоглобина хорошо изучена. Молекула гемоглобина (Hb) состоит из 4 полипептидных цепей (двух а-цепей по 141 аминокислоте и двух b-цепей по 146 аминокислотных остатков). Указанные 4 цепи гемоглобина – это белковый компо-нент гемоглобина, называемый глобином. Каждая цепь связана с одним гемом (небел-ковое вещество, простетическая группа) (см рисунок). Связь между гемом и соответс-твующей полипептид ной цепью осуществляется за счет координационных связей атома железа (показана пунктирной линией) с остатками гистидина в цепях, причем один остаток более отдален от атома железа в центре гема, значит, связь слабее и при нали-чии опреде ленной концен трации кислорода соединение этого остатка гистидина с Fe прерывается, его место занимает молекула кислорода (красным цветом). Связь O2 с Fe также не проч ная: гем (железо) не окисляется. Происходит оксигенация Hb (прикрепление молекулы кислорода).

Рис.1. Структура гемоглобина и гема



Четвертичная структура гемоглобина (2 а и 2 b – цепи, связанные с гемом (красные кольца)
Рядом показана структура оксигенироваанного гема

Именно эти обстоятельства обеспечивают присоединение и отдачу кислорода (дезоксигенацию) в зависимости от определенных факторов (см ниже). Один моль гемоглобина может связать до 4 молей кислорода. Объём одного моля идеального газа составляет 22,4 *л*. Уровень количества всего гемоглобина в крови ~64,5 г. Весь гемогло бин крови может связать 4 · 22,4 *л* кислорода, а 1 г гемоглобина может связать 1,39 *мл* кислорода. Но при реальном химическом анализе получают меньшую величину, 1,34 ÷ 1,36 *мл* кислорода на 1 г гемоглобина. Это обусловлено тем, что небольшая часть гемоглобина (в норме) находится в химически неактивной форме (при некоторых заболеваниях уровень неактивной формы может сильно увеличиваться). Таким образом, ориентировочно можно считать, что в организме здорового человека 1 г гемоглобина связывает 1,34 *мл* кислорода. Этот показатель способности гемоглобина связывать кисло род называют по имени первооткрывателя коэффициентом Хюфнера. В одном эритроците содержится до 250 млн молекул гемоглобина, т.е.1 эритроцит может переносить до 1 миллиарда молекул O2 .

Итак, основной функцией Hb является перенос газов

Как работает гемоглобин

Перенос кислорода от легких к тканям

В легких: Hb + O2 → HbO2 ; в тканях: HbO2 → Hb + O2 → → Тканевое дыхание (биологическое окисление). При этой реакции валентность атома железа в геме не изменяется, т.е. не происходит окислительно- восстановительных превращений, а только -*оксигенация и дезоксгенация*.

Одна молекула гемоглобина, как уже сказано, переносит 4 молекулы кислорода, причем больше времени требуется для присоединения первой молекулы кислорода, далее – вследствие конформационных изменений при оксигенации гемоглобина- каждая последующая молекула кислорода присоединяется к гемоглобину более легко, т.е. в данном процессе наблюдается *кооперативность действия.*

Связывание 2,3- дифосфоглицерата (2,3 ДФГ) с гемоглобином происходит по принципу эквимолярности, т.е. 1 молекула 2,3 ДФГ/ 1 молекула Hb. Молекула 2,3 ДФГ прикрепляется между 2β-цепями HbA. Она формируется из 1,3-ДФГ при гликолизе. В периферических тканях уровень 2,3 ДФГ достаточно высокий, поэтому он связывается с Hb и ослабляет его сродство к O_2, который при этом отделяется от гемоглобина и поступает в плазму крови, а оттуда в клетки органов и тканей (O_2 беспрепятственно проходит через мембранные структуры клеток и через цитозоль, так же , как вода, углекислый газ, оксид азота, окись углерода). HbF не связывается с 2,3 ДФГ и поэтому постоянно имеет более высокое сродство к кислороду. O_2 может транспорти-роваться от матери в кровь плода. Изменение уровня 2,3 ДФГ играет важную роль в адаптации к гипоксии: в ситуациях, ассоциированных с гипоксемией, количество 2,3ДФГ в эритроцитах повышается, сродство Hb к O_2 падает и поступление O_2 в ткани усиливается

Факторы, способствующие диссоциации HbO_2	Факторы, способствующие образованию HbO_2
1. Высокое р O_2	1. Низкое р O_2
2. Низкое р CO_2 (Р -парциальное давление)	2. Высокое р CO_2
3. Мене кисла среда	3. Более кислая среда
4. Более низкая температура	4. Более высокая температура
5.Низкий уровень 2,3ДФГ	5. Высокий уровень 2,3дфг

Перенос гемоглобином CO_2 от тканей к легким

CO_2 (углекислый газ)-конечный продукт метаболизма ,- он получается в результате окислительного декарбоксилирования пирувата, α-кетоглута рата, ряда аминокислот при образовании из них биогенных аминов, но основным поставщиком CO_2 является цикл трикарбоновых кислот, в который, как известно, включаются 90-95% ацетил-КоА, общего промежуточного продукта, образующегося при катаболизме углеводов, липидов и аминокислот. CO_2 поступает из тканей в кровь, часть его (~ 5%) переносится плазмой крови, а остальная часть попадает в эритроциты, где под влиянием фермента карбоангидразы превращается в угольную кислоту

$$CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3\ (H^+ + HCO_3^-).$$

Существуют два пути переноса угольной кислоты гемоглобином:

1. Прямой путь

$H_2CO_3 + H_2N\text{-}Hb \rightarrow H_2O + Hb\text{-}NH\text{-}CO_2H$ (карбаминогемоглобин)

Карбаминогемоглобин вместе с венозной кровью попадает в легкие, где происходит обратный процесс, освободившаяся угольная кислота разлагается карбоангидразой на H_2O и CO_2, которые выделяются с выдыхаемым воздухом.

2.Непрямой путь.

В данном случае имеют значение буферные системы, образуе мые гемоглобином: H Hb/ KHb (гемоглобиновый буфер, эритроциты венозной крови) и $HHbO_2$/ $KHbO_2$ (оксигемоглобиновый буфер, эритроциты артериальной крови). Угольная кислота диссоциирует сильнее, чем гемоглобиновая кислота (HHb), поэтому происходит реакция (буферное действие):

$$H_2CO_3 + KHb \rightarrow KHCO_3 + HHb$$

Содержащаяся в эритроцитах артериальной крови оксигемоглобиновая кислота = $HHbO_2$- уже сильнее, чем угольная кислота, поэтому происходит реакция

$$HHbO_2 + KHCO_3 \rightarrow HbO_2 + H_2CO_3.$$

Угольная кислота, которой в артериальной крови немного, разлагается в альвеолах легких карбоангидразой на H_2O и CO_2. Последние удаляются из легких с выдыхаемым воздухом. Непрямым путем выводится около 20% CO_2. Перенося CO_2, гемоглобин предохраняет организм от закисления (ацидоза), так как задержка угольной кислоты в крови приводит к накоплению H^+ и сдвигу pH в кислую сторону; на долю гемоглобино вой буферной системы приходится около 75% от всей буферной емкости крови. Из сказанного понятно, при гипогемоглобинемии ухудшаются и транспорт CO_2 и буферное действие гемоглобина.

Без кислорода жизнь животных и человека невозможна: именно в присутствии кислорода совершаются все наиболее эффективные энергетические процессы. Для срав нения: в анаэробных условиях расщепление одной молекулы глюкозы дает 2 молекулы АТФ (Аденозинтрифосфата, универсальной энергетической валюты в клетках), а окисле ние той же глюкозы в аэробных условиях (в присутствии кислорода) дает в 18 раз больше АТФ.

Как в общей практике исследуется содержание гемоглобина в крови

Из сказанного выше понятно, что гемоглобиновый тест крови является очень важным показателем в общем клиническом анализе крови. Изменения величины данного показателя, особенно, ее снижение, указывают на наличие или отсутствие анемии у обсле дуемого больного. Существует несколько методик для выполнения этой задачи.

Гемиглобинцианидный метод. Метод основан на переводе всех форм Hb в одну форму– HbCN (цианметгемоглобин). Перевод Hb в HbCN осуществляется при его взаимодействии с трансформирующим раствором, содержащим феррицианид калия, цианид калия, дигидрофосфат калия и неионный детергент.

В настоящее время для определения Hb в крови разработан новый колориметри ческий метод, получивший название гемихромного. **Гемихромный метод основан на переводе всех форм Hb в одну форму – гемихром (HbChr)**. При этой модификации не применяются опасные для лаборанта цианиды. При взаимодействии Hb с трансформиру ющим раствором происходит его превращение в окисленную низкоспиновую форму – гемихром, который имеет красноватый цвет; интенсивность его прямо пропорциональна концентрации Hb в пробе. Оба метода позволяют получить количественные представ ления лишь об *общем уровне гемоглобина*, который складывается, по крайней мере, из 5 форм: дезоксигемоглобин (Hb), оксигемоглобин (HbO_2) и 4 так называемых патологических форм (хотя они формируются и в здоровом организме), - карбоксиге моглобин (HbCO), metHb (Fe^{+3}) и гликозилированный гемоглобин (HbA1c). Имеется еще одна форма гемоглобина, а именно: HbS, сульфгемоглобин. Нормальную дыхательную функцию выполняют лишь две формы –Hb и HBO_2 .

Когда цианметгемоглобиновый метод внедрялся в лабораторную диагностику как стандартный метод во всем мире (это было в 1963 году), уже были известны метгемогло бин и карбоксигемоглобин. Но считалось, что они образуются лишь при отравлениях, например, нитритами и угарным газом, поэтому их назвали их патологическими произ водными гемоглобина, и общепринятый метод определения гемоглобина особых вопросов не вызывал. Полагалось, что с его помощью выявляется только функционально активный гемоглобин. Но со временем появились новые факты из биографии гемоглобина.

Считавшиеся патологическими формы гемоглобина, как выяснилось, образуются постоянно и в организме здорового человека, причем, не за счет поступления извне различных ядов, а в ходе жизнедеятельности клеток

органов и тканей появляются вещес тва, которые превращают гемоглобин в метгемоглобин, карбоксигемоглобин, сульфгемо глобин, гликозилированный гемоглобин. И такого рода веществ может появляться в клетках разное количество, в некоторых случаях – очень много. "Ненормальные" типы гемоглобина, эти плохие ребята, не приходят из других мест, а свои нормальные, актив ные, формы гемоглобина все больше и больше превращаются в этих "плохишей", своих хороших ребят остается все меньше, а значит, с газообменом дела будут обстоять все хуже и хуже. Но если при этом провести анализ на общий гемоглобин, то он отклонений от нормы не покажет, ставя лечащего врача в тупик. Все это напоминает картину девальвации валюты. Но пора уже говорить не о патологических производных гемогло бина, а о гиперметгемоглобинемии, гиперкарбоксигемоглобинемии и т.д. Как о гипергли кемии (повышении концентрации глюкозы в крови), гиперхолестеринемии, гиперазоте мии (повышение в крови уровня азотсодержащих продуктов метаболизма) и т.д.

Рис 2. Рисунок, позволяющий заметить дефекты методы определения общего гемоглобина. Цифра 130 г/л взята условно (норма)

Ясно, что тактика выявления уровня общего Hb не отвечает ни запросам практической медицины, ни потребностям чистой науки. Учитывая, что речь о больных, с картиной патологии у которых предстоит врачу хорошо разобраться, необходимо исследование в одной и той пробе крови содер жания "патологических" типов Hb и обязательно -содержания активного гемоглобина (Hb +HbO_2).

Только тогда можно говорить об обеспеченности организма больного жизненно важным кислородом.

Откуда берутся плохие формы гемоглобина

Чтобы сказанное стало более очевидным, следует кратко сказать, когда и почему накапливаются "патологические" типы гемоглобина. Ведь от "плохих" ребят следует ожидать всяких неприятностей, и еще каких!

Надо сказать, что молекула гемоглобина – весьма притягательная особа, гены, ее кодирующие, также не остаются в стороне от разного рода соблазнов.. Различные фак торы оставляют свои следы как на белковом компоненте, так и на простетической (небел ковой) группе, т.е. на гемах Hb.

К первой группе изменений относятся *гемоглобинопатии.* Известно от 200 до 600 вариантов гемоглобинопатий. Из них лишь некоторые проявляются в виде заболеваний, в основе которых лежит нарушение транспорта кислорода или накопление метгемоглобина

Дефекты, обусловленные заменой аминокислоты в полипептидной цепи гемогло бина (или качественные изменения). Известно более 20 видов гемоглобина, в α- или β-цепи которых одна из аминокислот заменена другой. Такая замена изменяет ряд физико-химических свойств белка, в частности электрофоретическую подвижность, что позволяет идентифицировать вариант гемоглобина.

Дефекты, обусловленные заменой аминокислоты в полипептидной цепи гемогло бина (или качественные изменения). Известно более 20 видов гемоглобина, в α- или β-цепи которых одна из аминокислот заменена другой. Такая замена изменяет ряд физико-химических свойств белка, в частности электрофоретическую подвижность, что позволяет идентифицировать вариант гемоглобина.

При *серповидноклеточной анемиии* в эритроцитах больного содержится гемоглобин (HbS): β6Глу → Вал (в β-цепях Hb остаток Глу в положении 6 заменен на остаток Вал, -нарушается заряд белка, так как глутаминовая кислота содержит лишнюю диссоциирующую карбоксильную группу, а Валин – моноаминомонокарбоновая кислота). *Глу – остаток глутаминовой кислоты, Вал – остаток валина*

Указанное замещение вызывает снижение растворимости Hb внутри эритро-цитов, отдельные молекулы Hb образуют длинные цепи, что приводит к снижению устойчивости эритроцитов к гемолизу (разрушению) и укорочению жизни красных кровяных телец, которые под микроскопом имеют форму серпа. Причиной сравнительно широкого распространения *серповидноклеточной* (см. рисунок) анемии в районах, эндемичных по тропической малярии, считают способность малярийного плазмодия вызывать в эритро цитах образование HbS. У взрослых течение болезни характеризуется умеренной анемией, снижаю щей трудоспособность. Кризы (повышенный гемолиз, острая болезнен ность в участках эритростаза, боль в костях) провоцируются инфекциями, стрессовыми факторами.

Метгемоглобинемии – группа гемоглобинопатий, при которых имеется дефект, затрудняющий восстановление железа из трех – в двухвалентное состояние. У этой группы гемоглобинов остаток гистидина, участвующий в связывании железа, замещен другими аминокислотами – тирозином, глутаматом; при таких изменениях связь между Fe и указанными остатками аминокислот становится более прочной, чем в норме, поэтому при даже при высокой концентрации O_2 не способен прикрепиться к гему Hb. Из этого становится понятным, что способность к транспорту кислорода утрачивается. В крови нередко возрастает уровень метгемоглобина.

Дефекты, обусловленные нарушением синтеза цепей гемоглобина (количественные изменения). Имеется несколько вариантов патологии.

α-Талассемия – в основе заболевания лежит нарушение синтеза α-цепей, что ведет к уменьшению образования всех физиологических видов гемоглобина. Избыточно появ ляющиеся β и γ-цепи не могут взаимодействовать с мутантными α-цепями, вследствие чего возникают два вида гемоглобина: Hb β4 (HbH) и Hb γ 4 (гемоглобин Бартса).

β-Талассемия - вызвана нарушением синтеза β-цепей, что приводит к относитель- ному избытку α-цепей и сопровождается усиленным образованием гемоглобина F (феталь ный гемоглобин) ($\alpha_2\ \gamma_2$) и A_2 ($\alpha_2\ \delta_2$). Последняя форма гемоглобина обладает достаточной способностью к транспорту кислорода, обеспечивающей компенсацию дефицита гемогло бина А.

σ-Талассемия – связана с торможением синтеза β и σ-цепей, что ведет к увеличен ной продукции гемоглобина F ($\alpha_2\ \gamma_2$).

При всех видах талассемии нарушается продукция эритроидных клеток в костном мозге и насыщение эритроцитов гемоглобином. Это проявляется в виде микроцитоза (уменьшение размеров эритроцитов) и снижения эритроцитарных индексов.

При ряде патологических ситуаций (отравление угарным газом, нитритами и нитра тами, врожденных аномалиях и др.) количество "патологических" форм гемогло-бина (все нефизиологические формы гемоглобина в настоящее время принято обозначать как ***дисгемоглобины***) резко возрастает за счет соответствующего снижения количества физиологических форм дан ного пигмента.

Метгемоглобинемии. У здоровых лиц метгемоглобин, отличающийся наличием трехвалентного (окисленного) железа, составляет до 4% от всего гемоглобина. При продолжительных воспалительных процессах фагоцитами нарабатывается большое коли чество оксида азота (NO), значительная часть которого HbO_2 переводит в метгемоглобин ($HbFe^{+3}$), не способный осуществлять транспорт O_2 и CO_2 вместо нормального гемогло бина. Макрофаги (одни из белых клеток крови) для борьбы с бактериями вырабатывают большие количества свободных радикалов, в том числе и оксид азота. При этом в макрофагах под влиянием бактериального липополисахарида (компонент стенки бактерий) активируется очень мощный, сложно устроенный фермент *индуцибельная синтаза оксида азота*, который из аминокислоты аргинина нарабатывает NO. От оксида азота у большинства бактерий нет защиты, поэтому они умерщвляются и затем пожираются (фагоцитируются). Но некоторые бактерии (туберкулезная палочка, хеликобактер Пайлори и др.) научились увертываться от такого грозного оружия. Но макрофаги все равно продолжают выполнять свои обязанности. В очаге инфицирования их накапливается очень много, соответственно они и вырабатывают огромные концентрации NO, от которого организм каким-то образом вынужден избавляться. Часть такого рода снарядов утилизируется эритроцитами (см схему): гемоглобин в десятки тысяч раз сильнее притягивает к себе NO, чем свой "род ной" молекулярный кислород.

Оксид азота, преодолевая все преграды – гидрофильную цитоплазму клетки и ее липофильную мембрану, - неистово стремится в эритроциты, - к ней, к вожделенной молекуле гемоглобина. Далее происходят жаркие объятия между оксигемоглобином и NO, в результате чего нарождается нитрат (NO_3). Но за все приходится платить и гемоглобин окисляется ($Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$) и превращается в совершенно немощный (с точки зрения способности переносить O_2) метгемоглобин. Такие процессы совершаются постоянно и в здоровом организме, но в умеренных количествах. Природой это учтено: с участием специальной ферментной системы *метгемоглобинредуктазы* и расходования продукта гликолиза, который довольно интенсивно протекает в эритроцитах, а именно: кофермента никотинамидадениндинуклеотида (НАДН), метгемоглобин худо-бедно приобретает прежние силы ($Fe^{+3} + e \rightarrow Fe^{+2}$). Однако многочисленные исследования показали, что мощность данной ферментной системы ограничена. Нередко один из активных компонентов ее цитохром b_5, переносящий электрон (е) непосредственно на атом окисленного железа, оказывается с генетическим дефектом, реакции восстановле-ния меттемоглобина тогда не происходит. По той и/или другой причине постепенно MetHb накапливается в эритроцитах (крови). А это значит, что нормального гемоглобина остается все меньше и меньше: ткани не дополучают жизненно важного кислорода. Но если при этом измерить содержание общего гемоглобина существующими методами, ничего подобного выявить не удастся. Он может быть в пределах нормы (у мужчин 130-150 г/л, у женщин – 120-140 г/л). В этом - главный изъян данного метода.

Рис 3. Пути превращения гемоглобина в метгемоглобин при хроническом воспалении

Рис 4. Пути возможного восстановления метгемоглобина в нормальный гемоглобин

Гиперметгемоглобинемия служит маркером гиперпродукции оксида азота, который не только пере-

водит Hb в MetHb, но еще и как свободный радикал, в различ-ных частях организма инициирует оксидативный стресс, повреждающий мембраны, белки и хромо-сомы, в результате создается опасная картина заболевания, которой, если судить по показателю общего гемоглобина, не должно быть. Поскольку по разным причинам в клинических лабораториях химические проявления оксидативного стресса не всегда исследуются, то не все врачи своевременно "замечают" молекулярные нару-шения у больных. Высокая концентрация оксида азота в крови нарушает агрегацию тромбоцитов, ослабляя свертывающую систему. Результаты анализа общего гемоглобина могут ввести в заблуждение врачей и некоторых научных работников. Вполне возможно, что при различных онкологических заболеваниях также может быть обнаружены изменения тех или иных производных гемоглобина: меттемоглобина (воспалительные процессы), снижение синтеза гемоглобина и его активности (изменения образования цитокинов, участвующих в регуляции гемопоэза, уровня 2,3-дифосфоглице-рата, эротропоэтина) и т.д.

Рис 5. Местные анестетики и метгемоглобинемия

Гликозилированный гемоглобин

При хронической гипергликемии, помимо повышения уровня HbA1c, подвергаются изменениям вследствие гликирования и многие другие внеклеточные и внутриклеточные белки с образованием *поздних продуктов гликации*, которые свидетельствуют о глубо ких повреждениях в органах и тканях: межцепочечные сшивки, изменения межпозвоно чных дисков, нарушение зрения и т.д.. Так что не всегда сладкое (много сахара) означает сладкую жизнь.

Совсем недавно немецкими учеными (Berndt Zur) открыт новый тип гемоглобина, который в последствии получил название *Haemoglobin Bonn*. В отличие от других типов гемоголобина, HbBonn очень быстро насыщается кислородом (для сравнения: остаток желудка после резекции наполняется пищей гораздо быстрее, чем нормальный желудок), так что при нормальном уровне гемоглобина кровь содержит кислорода значительно ниже положенной концентрации, нередко данную патологию путают с врожденными пороками сердца, сердечной недостаточностью и т.д.

Уважаемые коллеги, я очень хотел, чтобы у вас по прочтении данного материала, возник вопрос: Сколько же человек в мире ходит с неправильно установленной картиной гемоглобинемии = с не замеченной вовремя гипоксией?

Рис 6. Гликозилирование молекулы гемоглобина

Hb-Ac обозначают гемоглобин взрослого, уровень которого в крови здорового человека около 12-14 %. HbA1 - глюкозосодержащий гемоглобин (связанный с сахаром), и он составляет около 5-7 % от гемоглобина взрослого человека. HbA1 разделяется на подгруппы в зависимости от того, какой вид сахара он связывает, в частности, HbA1c является подгруппой HbA1 и поэтому его процентное содержание ниже, чем общего HbA1. Накопление в крови гликозилированного гемоглобина является явным свидетельством того, что при этом происходит также присоединение глюкозы к многим другим белкам (альбуминам, рецепторным белкам, внутриклеточным белкам и др.). В результате такого рода процессов формируются конечные продукты гликации. Конеч-ные продукты гликирования, образующиеся при неферментативной гликации и окисле-нии белков, являются биомаркерами метаболического стресса и фактором, способствую-щим прогрессированию целого ряда хронических заболеваний: атеросклероза, диабета и болезни Альцгеймера. Накопление конечных продуктов гликирования у здоровых людей происходит с возрастом. Однако, данный процесс протекает значительно быстрее у людей с диагнозом «диабет» или «почечная недостаточность». КПГ могут запускать множество аномальных процессов в клетках и тканях: патологическую выработку цито-кинов и других факторов роста, аккумуляцию внеклеточного матрикса, прогрессирова-ние сосудорегуляторной дисфункции, инициирование клеточной смерти. Таким образом, оценка и контролирование данного показателя является очень важной, особенно при диагностике осложнений диабета (атеросклероз, почечная недостаточность, слепота), сердечно-сосудистых заболеваний, почечной недостаточности, неврологических расстройств и др.. Прибор для измерения уровня КПГ (= AGE= advanced glycated end products) создан. Это AGE -Reader

AGE-reader - первное и единственное диагности-ческое устройство, которое неинвазивно измеряет содержание КПГ в тканях при помощи флуорес-ценции ультрафиолетового света. Это инновации-онное устройство позволяет прогнозировать риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, диабета и почечной недостаточности.

Ридер КПГ представляет собой уникальный инструмент для клиницистов и исследователей, с его появлением открываются новые горизонты в определении КПГ и оценки риска различных заболеваний.

Литература

1. Козлов А.А. Гемоглобинометрия. // Лаборатория, 1998; № 11, 20–21.2
2. Пупкова В.И., Офицеров В.И. Набор реагентов «Гемоглобин-Ново» для бесцианидного определения гемоглобина. // Новости «Вектор-Бест», 1998; № 4, 8–9.
3. Осипов А.Н,Борисенко Г.Г, Владимиров Ю.А. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов //Успехи биологической химии. 2007.т. 47.с 259-292
4. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. Под ред. проф. Норберта У. Тица. Гл. редактор русского изд. проф. В.В. Меньшиков. Издательство Лабинформ, М., 1997, 128.
5. Ganz, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. Blood. 2003;102:783–8.

СОВРЕМЕННАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ПРАКТИКА С ПОЗИЦИЙ ДОКАЗАТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

А.А. Кишкун

д.м.н., заслуженный врач РФ,
медицинский директор ООО «Медицинская компания»,
г. Москва, РФ

Аннотация

Проведен анализ проблем взаимодействия клинической практики и клинической лабораторной диагностики. Показаны роль и значение принципов доказательной медицины в выборе оптимального перечня лабораторных анализов для диагностики заболеваний, организации технологических процессов в клинико-диагностической лаборатории и внедрению новых лабораторных методов в клиническую практику.

The analysis of problems of interaction of clinical practice and clinical laboratory Diagnostics. Shows the role and importance of the principles of evidence-based medicine in choosing the best list of laboratory tests to diagnose diseases, organization of technological processes in clinicodiagnostic laboratory and the introduction of new laboratory methods in clinical practice.

Ключевые слова: доказательная медицина, диагностические карты.

С позиции современной клинической практики, доказательная лабораторная медицина должны решать задачи разработки наиболее эффективных, безопасных и экономически обоснованных современных диагностических стратегий, способствуя выбору оптимального варианта в каждом конкретном клиническом случае. Рассмотрим несколько примеров, использования данных клинических рекомендаций, в клинической и лабораторной практике. В отношении клинической практики остановимся на возможности составления научно обоснованной диагностической карты лабораторного обследования пациента с внебольничной пневмонией на основании клинических рекомендаций.

Внебольничная пневмония является частым и серьезным заболеванием несмотря на новые мощные антибактериальные препараты и вакцины. В США пневмонии занимают 6 место среди причин смерти и первое место среди причин смерти от инфекционных заболеваний. Число случаев внебольничной пневмонии составляет ежегодно приблизительно от 5 до 6 млн. и более 1,1 млн. из них подлежат госпитализации (11).

У амбулаторных пациентов смертность от пневмонии остается низкой и колеблется от 1 до 5 %, среди пациентов подлежащих госпитализации смертность составляет 12 % и увеличивается у пациентов с бактериемией и пациентов домов престарелых и доходит до 40 % у пациентов, требующих интенсивной терапии (13). В России частота пневмонии составляет 3-15 человек на 1000 населения, смертность от внебольничной пневмонии составляет 5 %, у пожилых лиц 30 % (1).

Лабораторные исследования являются одной из важных составляющих при диагностике и выборе тактики ведения больных с пневмонией. Для выбора адекватного перечня лабораторных исследований у больных внебольничной пневмонией и составления диагностической карты обследования, обратимся к международным клиническим руководствам по данной проблеме.

В клиническом руководстве Американского торакального общества «Guidelines for the Management of Adults with Community-acquired Pneumonia. Diagnosis, Assessment of Severity, Antimicrobial Therapy, and Prevention» (7), вышедших в марте 2001 г, представлены следующие разделы:

- краткий обзор доступных данных по методологии вопроса;
- обзор наиболее этиологически значимых патогенов внебольничной пневмонии, включая дискуссию о резистентности пневмококка;
- предложен подход к стратификации пациентов для предсказания наиболее вероятных возбудителей заболевания;
- рекомендации по диагностическим исследованиям;
- предложения по показаниям к госпитализации пациентов и необходимости в интенсивной терапии;
- рекомендации по антибиотикотерапии внебольничной пневмонии, включая принципы терапии каждой категории пациентов;
- обсуждение вопроса, когда возможен перевод пациента на терапию per os и когда можно выписывать пациентов с внебольничной пневмонией, ответивших на начальную терапию;
- рекомендации по использованию пневмококковой и гриппозной вакцин.

В данных рекомендациях определены наиболее часто встречающиеся у больных пневмонией этиологические микроорганизмы на основании анализа опубликованных научных исследований по данной проблеме и приведены определяющие диагностические тесты. Наиболее важным для нас является то, что рекомендации делят все лабораторные тесты на три класса или уровня:

класс I – обязательные (с доказанной эффективностью);

класс II – необязательные (при отсутствии убедительных доказательств эффективности в контролируемых исследованиях);

класс III – отсутствие контролируемых исследований, используются в практике только на основе «мнения эксперта»).

В соответствии с данными клиническим рекомендациями диагноз пневмонии устанавливается на основании жалоб пациента, данных физикального обследования и

стандартной заднепередней и боковой рентгенографии легких.

В клинических рекомендациях констатируется, что как только диагноз внебольничной пневмонии установлен, необходимо определить этиологический диагноз с помощью современных диагностических тестов. Если этиология точно определена, то терапия более адекватна и рентабельна. Но реальное решение этой задачи должна ограничиваться двумя факторами. Первый, эти исследования не должны затягивать начало лечения. В рекомендациях констатируется, что 30-дневная летальность у больных пневмонией увеличивается при назначении первой дозы антибиотика спустя 8 ч и позже после поступления в стационар. Второе, так как у пациентов с пневмонией в качестве этиологического фактора рассматривается возможность наличия смешанной инфекции, наличия атипичных бактерий (этиологическая диагностика, которых может занимать дни или недели) ценность этиотропной терапии, зависящей от идентификации этиологии заболевания спорна. В исследованиях на больших популяциях показано, что исходы лечения лучше там, где лечение было назначено с учетом атипичных микроорганизмов (II уровень доказательности). Доказано, что микроскопическое исследование окрашенной по Граму правильно собранной мокроты, является полезным для назначения начальной антибактериальной терапии. Практическое использование этого метода ограничено тем, что некоторые пациента не могут собрать мокроту, у других получаемый секрет не соответствует предъявляемым к нему требованиям. В рекомендациях указывается, что секрет нижних отделов дыхательных путей (мокрота) не контаминирован оральной флорой, когда в нем имеется менее 10 эпителиальных клеток и более 25 нейтрофилов. Кроме того, результаты исследования мокроты по Граму не всегда коррелируют с результатами исследования бронхоальвеолярного лаважа или гемокультуры. Однако исследование мокроты может быть диагностически значимым для обнаружения микобактерий, грибов, пневмоцист.

При культуральном бактериологическом исследовании мокроты часто идентифицируют патогенные микроорганизмы, однако диагностическая чувствительность и специфичность их обнаружения для установления этиологического диагноза пневмонии невелики и эти результаты должны быть сопоставлены с преобладающим видом микроорганизмов, выявленных при микроскопическом исследовании мазков окрашенных по Граму. Вместе с тем, выделение из культуры мокроты микроорганизмов не являющихся частью нормальной респираторной флоры имеет важное клиническое значение. Использование специализированных исследований на микобактерии и легионеллу могут быть ценны при определенных клинических обстоятельствах. Когда у пациента подозревается наличие метициллин-резистентного патогена, других резистентных микроорганизмов или возбудителей заболевания, неохваченных при использовании обычной эмпирической антибиотикотерапией (как золотистый стафилококк), или, если пациент имеет факторы риска или получал антибиотики до госпитализации, исследование культуры мокроты полезно. Исследование на вирусы не является актуальным для пациентов с внебольничной пневмонией и не должны проводиться. Однако в эпидемический сезон можно использовать быстрые методы обнаружения антигена вируса в мокроте.

Никакой доступный тест не может идентифицировать весь арсенал патогенов, каждое исследование имеет свои ограничения. Например, окрашивание мокроты по Граму и культуральное исследование могут противоречить, эти тесты также неспособны обнаруживать «атипичные возбудители» и респираторные вирусы. Кроме того, в нескольких исследованиях показано, что некоторые пациенты с внебольничной пневмонией могут иметь смешанную инфекцию.

Таким образом, клинические рекомендации указывают, что для пациента с внебольничной пневмонией при госпитализации в стационар начальные диагностические тесты должны включать исследование мазков мокроты, окрашенных по Граму, если предполагается лекарственно устойчивый микроорганизм или микроорганизм не охваченный обычной эмпирической терапией (II уровень доказательности). Кроме того, результаты окраски мазка мокроты по Граму необходимы чтобы оценить тяжесть заболевания.

С помощью бактериоскопии мазка мокроты, окрашенного по Граму, проводят предварительную оценку возможного этиологического агента. Окрашенный по Граму мазок мокроты исследуют до посева ее на среды, с целью оценки пригодности для культивирования и идентификации вероятного возбудителя. Мокроту считают пригодной, если в мазке, окрашенном по Граму, при малом увеличении микроскопа обнаруживают более 25 лейкоцитов и менее 10 эпителиальных клеток в поле зрения. Признаками качественного образца мокроты, который можно использовать для культивирования, является преобладание в ней лейкоцитов над эпителиальными клетками, а также наличие бактерий одного вида, которые располагаются внутри лейкоцитов или вокруг них.

Клинические рекомендации констатируют, что рутинные лабораторные тесты (клинический анализ крови, исследование электролитов, печеночных ферментов и функции почек, определение группы крови) имеют малую ценность для установления этиологического диагноза пневмонии, но могут быть полезны для прогноза и решения вопроса о госпитализации. Они показаны пациентам, нуждающимся в госпитализации, пациентам старше 65 лет или с сопутствующими заболеваниями (II уровень доказательности).

Для госпитализированных пациентов диагностические исследования должны быть сделаны быстро, чтобы избежать задержки с начальной терапией. Кроме рентгенограммы, определения группы крови, у госпитализированных пациентов должны быть сделаны полный и биохимический анализы крови (включая глюкозу, бикарбонат, печеночные и почечные тесты и электролиты - относятся к III уровню доказательности). Все госпитализированные пациенты должны быть обследованы на насыщение гемоглобина кислородом методом чрезкожной оксиметрии. Газы артериальной крови должны быть определены у тяжелых больных и у пациентов с хроническим заболеванием легких. Бактериологическое исследование мокроты рекомендуется, если подозревается лекарственно резистентный микроорганизм или не охваченный эмпирической терапией. Необходимо получить мокроту до назначения антибиотика. Бактериоскопическое исследование мокроты, окрашенной по Грамму, необходимо для возможной коррекции эмпирической антибиотикотерапии (при обнаружении стафилококка, грамотрицательных бактерий). До назначения антибиотика должны быть взяты 2 пробы крови, что может помочь в выявлении бактериемии и резистентных патогенов. Любой существенный плевральный выпот (более 1см

на латеральной рентгенограмме) или любой выпот разделенный на камеры должен быть получен до назначения антибиотика, чтобы исключить возможность эмпиемы, однако нет данных показывающих улучшение исходов при задержке назначения антибиотика до торакоцентеза. При получении плевральной жидкости ее необходимо исследовать, включая определение цитоза, общего белка, ЛДГ, pH, окрашивание по Граму, на кислотоустойчивые бактерии, грибы и микобактерии.

Серологические исследования и холодовые агглютинины не полезны для начальной диагностики у больных с внебольничной пневмонии и не должны назначаться (II уровень доказательности). Серологические исследования в острый и в период реконвалесценции полезны для ретроспективной оценки и эпидемиологических исследований. Когда подозревается легионеллезная этиология (у пациентов с тяжелой внебольничной пневмонии) необходимо исследовать мочу на наличие антигена бактерий. Исследование антител в сыворотке крови используют у больных с распространенным кокцидиомикозом. Специальные тесты для исследования микробных антигенов с использованием моноклональных антител и полимеразной цепной реакции (ПЦР) не показали своей ценности и не используются как рутинные исследования для пациентов с внебольничной пневмонией. Было описано множество инвазивных методов исследования флоры без загрязнения орофарингеальной флорой. К таким методам относятся транстрахеальная аспирация, бронхоскопия с защищенной браш биопсией, бронхоальвеолярный лаваш, трансторакальная биопися легких. Эти процедуры не показаны у большинства пациентов с внебольничной пневмонией (III уровень доказательности), но могут быть полезными для уточнения диагноза у тяжелых пациентов, хотя по данным проспективных исследований это не улучшает исходы. Правильно взятый бронхо-альвеолярный лаваш и защищенная браш биопсия несут меньше риска, чем биопсия легкого и имеют высокую диагностическую чувствительность и специфичность.

У пациентов со сниженным иммунитетом диагностические исследования могут быть расширены. В клинических рекомендация определены показания для госпитализации пациентов с внебольничной пневмонией:

- возраст более 65 лет.
- наличие сопутствующих заболеваний типа:
- хроническая обструктивная болезнь легких, бронхоэктазы, злокачественные заболевания, сахарный диабет, ХПН, застойная сердечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность, алкоголизм, истощение, цереброваскулярная болезнь, постспленэктомия;
- госпитализация в течение последнего года;
- физикальные признаки:

  число дыханий более 30 в мин;

  диастолическое артериальное давление менее 60 мм рт.ст., систолическое – менее 90 мм рт.ст.;

  пульс более125 ударов в мин;

  температура тела менее 35° С и более 40° С;

  снижение уровня сознания;

  наличие участков экстрапульмональной инфекции.
- лабораторные признаки:

  количество лейкоцитов в крови менее $4{,}0 \cdot 10^9$/л и более $30{,}0 \cdot 10^9$/л или нейтропения менее $1{,}0 \cdot 10^9$/л;

  pO_2 артериальной крови ниже 60 мм рт.ст. или pCO_2 более 50 мм рт.ст. при дыхании комнатным воздухом;

  нарушение почечной функции – креатинин сыворотки более 1,2 мг% или мочевина более 20 мг%;

  гематокрит менее 30 % или гемоглобин ниже 90 г/л;

  доказательства сепсиса или органной дисфункции по метаболическому ацидозу или коагулопатии;

  pH артериальной крови ниже 7,35.

Приведенный краткий анализ клинических рекомендаций Американского торакального общества дает четкое представление, какие лабораторные тесты необходимо выполнить пациенту с внебольничной пневмонией с позиций доказательной медицины.

Теперь рассмотрим клинические рекомендации Европейского респираторного общества «Guidelines for management of adult community-acquired lower respiratory tract infections» [8]. Данные рекомендации предусматривают следующий спектр лабораторных тестов у пациентов с внебольничной пневмонией:

- подсчет количества лейкоцитов периферической крови;
- биохимическое исследование сыворотки (калий, натрий, глюкоза, мочевина, креатинин);
- исследование газового состава крови;
- исследование мокроты;
- взятие и исследование 2 проб крови на гемокультуру;
- серологическое исследование крови на наличие антител при подозрении на атипичные агенты;
- исследование мокроты или мочи на наличие пневмококкового антигена и антигена L. pneumophila в моче при наличии факторов риска (возраст более 65 лет, наличие сопутствующих заболеваний типа: хроническая обструктивная болезнь легких, бронхоэктазы, злокачественные заболевания, сахарный диабет, ХПН, застойная сердечная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность, алкоголизм, неврологические заболевания, вирусные инфекции);
- определение уровня С-реактивного белка в сыворотке (при наличии факторов риска);

при тяжелой пневмонии, нуждающейся в искусственной вентиляции легких показано проведение бронхоскопии с защищенной браш биопсией и последующим определением пневмококкового и L. pneumophila антигена; исследование бронхо-альвеолярного лаваша показано при подозрении на наличие опортунистических агентов;

- при наличии жидкости в плевральной полости необходимо ее исследовать.

Согласно рекомендациям Европейского респираторного общества показаниями к госпитализации пациентов с внебольничной пневмонией являются следующие лабораторные критерии:

- количество лейкоцитов в крови менее $4{,}0 \cdot 10^9$/л и более $20{,}0 \cdot 10^9$/л;
- анемия – гемоглобин ниже 90 г/л;
- нарушение почечной функции – креатинин сыворотки более 1,2 мг/дл или мочевина более 20 мг/дл;
- pO_2 артериальной крови ниже 60 мм рт.ст. или pCO_2 более 50 мм рт.ст. при дыхании комнатным воздухом;
- ацидоз – pH артериальной крови ниже 7,30;
- признаки внутрисосудистого диссеминированного свертывания крови – удлинение протромбинового времени, тромбоцитопения, продукты деградации фибрина.

В рекомендациях указывается, что проведение перечисленных лабораторных исследований является полезным с позиций доказательной медицины, больным внебольничной пневмонией, так улучшает прогноз, сокращает сроки и затраты на лечение.

Клинические рекомендации содержат важную информацию по критериям начала и прекращения антибактериальной терапии у пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей. Так в клинических рекомендациях Американской медицинской ассоциации «Effect of procalcitonin-based Guidelines vs Standart Guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections» [14] рекомендован следующий алгоритм при назначении антибактериальной терапии на основании определения уровня прокальцитонина в сыворотке крови (рис. 2).

Рис. 2. Алгоритм назначения антибактериальной терапии у пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей.

Алгоритм прекращения антибактериальной терапии у пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей приведен на рис. 3.

Рис. 3. Алгоритм прекращения антибактериальной терапии у пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей.

На основании анализа данных международных клинических рекомендаций диагностическая карта с позиций доказательной медицины должна включать спектр лабораторных исследований приведенных в табл. 2.

Таблица 2. Диагностическая карта. Внебольничная пневмония. Продолжительность госпитализации 14-21 день

Место	**Приемное отделение**	**Пульмонологическое отделение**	
Продолжительность	**1-1,5 ч**	**1 сут**	**2-21 сут**
Лабораторные исследования			
1. Общеклиническое исследование крови	+		+ 1 раз в 7-10 дней
2. Биохимическое исследование крови: глюкоза, общий белок, креатинин, мочевина, АСТ, АЛТ, общий билирубин, калий, натрий	+		+ 1 раз в 7-10 дней
3. Биохимическое исследование крови: СРБ		+	+
4. Общеклиническое исследование мочи	+		
5. Общеклиническое исследование мокроты		+	
6. Бактериоскопия мокроты (до назначения антибиотиков)	+		

7. Посев мокроты на микрофлору (до назначения антибиотиков)	+		
8. Посев крови на гемокультуру (2-кратно до назначения антибиотиков)	+		
9. Исследование уровня прокальцитонина в сыворотке крови		+	+ По показаниям
10. Исследование крови на сифилис, HBs-антиген, антитела к вирусному гепатиту С и ВИЧ		+	
11. Определение группы крови и резус-фактора	+		
12. Исследование бронхиального смыва			+ По показаниям
13. Исследование КОС	+ По показаниям		
14. Серологические исследования (при подозрении на атипичный агент)			+ По показаниям

Диагностические карты могут применяться для любого заболевания или состояния. При их практическом внедрении следует ожидать, что примерно для 80 % больных диагностическая карта будет исполнена на 100 %. У оставшихся 20 % возникнут отклонения, причем у части из них отклонения будут существенными. Этого изначально следует ожидать, так как часть участников процесса оказания медицинской помощи (врачи лаборатории, клиницисты), ссылаясь на эти 20 % отклонений, будут высказывать скептическое отношение для дальнейшего использования диагностических карт. В связи с этим необходимо проявить определенное терпение. С самого начала следует предупредить сомневающихся, что диагностическая карта – это не универсальное средство для всех больных и всех видов исследований на все времена. Диагностическая карта повышает согласованность при оказании медицинской помощи и является полезным руководством при проведении исследований и лечении больных. Но это не означает, что диагностической карте надо следовать слепо. Совершенствование организации и методов диагностики во всех лечебных учреждениях является постоянным и динамичным процессом, так как появляются все новые возможности диагностики неотложных состояний, требующие своего внедрения в клиническую практику.

Литература

1. Кишкун А.А. Современные технологии повышения качества и эффективности клинической лабораторной диагностики. – М.: РАМЛД, 2005, 528 с.
2. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний. М.: Медицина. – 2002. – 568 с.
3. ADA Clinical Practice Guidelines. - AACCPress, 2007.
4. Corinne R. F. Defining & Reporting Critical Values. - www.aacc.org.
5. Evidence-based practice for point-of-care testing. - AACCPress, 2006.
6. Forsman R.W. Clinical Chemistry. – Vol. 42. – P. 813-816. – 1996.
7. Guidelines for the Management of Adults with Community-acquired Pneumonia. Diagnosis, Assessment of Severity, Antimicrobial Therapy, and Prevention. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2001. – Vol. 163. - P. 1730-1754.
8. Guidelines for management of adult community-acquired lower respiratory tract infections. // Eur. Respir. J. – 1998. – Vol. 11. – P. 986-991.
9. Improving Test Utilization: The Clinical Lab's Expanding Role. - October 26, 2010. - www.aacc.org.
10. Myers G.L., Miller W.G., Coresh J. et al. Creatinine Standardization Recommendations. - www.nkdep.nih.gov/labprofessionals/Niederman M.S., McCombs J.I., Unger A.N. et al. The cost of treating community-acquired pneumonia //Clin. Ther. – 1998. – Vol.20. – P.820-837.
11. Price C.P., Christenson R.H. Evidence-Based Laboratory Medicine: From Principles to Outcomes. AACC Press, 2003. – 279 p.
12. Ruiz M., Ewig S., Marcos M.A. et al. Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity //Amer. J. Respir. Crit. Care Med. – 1999. – Vol.160. – P.397-405.
13. Schuetz P. et al. Effect of procalcitonin-based Guidelines vs Standart Guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections // J. Am. Med. Assoc. – 2009. – Мщд. 302(10). – P. 1059-66.
14. The New ADA Guidelines: Using HbA1c in Diabetes Screening and Diagnosis. - March 31, 2010. - www.aacc.org.

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В КЛИНИКЕ

Б.С. Сейдуалиева

Центральная клиническая больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан

Современная клинико-лабораторная диагностика – это развитая отрасль производства важной медицинской информации. Циркулирующие в ней информационные потоки: информация от пациента, специалиста, аппаратуры, результаты исследований, показатели качества и эффективности и их анализ – требует четкой системы формализации и унификации данных. Поскольку лабораторная диагностика является одной из дорогостоящих отраслей системы здравоохранения, то создание адекватного обеспечения лечебных учреждений диагностической информацией будет способствовать максимальному выполнению основного их предназначения, адекватному оказанию медицинских услуг и повысить их качество и эффективность.

Центр лабораторной диагностики (ЦЛД) ЦКБ УД ПРК является одним из крупных многопрофильных лаборатории в республике, использующей современные методы исследования клинической биохимии, иммунологии, бактериологии, гематологии, а также широко применяющей иммунохимические, иммуноферментные, генно-молекулярные методы лабораторной диагностики.

Главная задача нашей лаборатории состоит в том, чтобы обеспечить пациента и врача-клинициста информацией, необходимой для лечения больного. Такая информация предоставляет ценность, только если она точна, соответствует клинической ситуации и правильно используется врачом при принятии решений.

Одним из актуальных важнейших задач, ставящих перед собой все медицинские учреждения и благополучно решенные в нашей клинике, является качество и надежность выполненных исследований. Вопросы качества в нашей клинике являются первостепенными, ведь мы внедрили международную систему менеджмента качества ISO 9001: 2000. Систематический контроль качества в лаборатории, проводимый по всем тестам специальным контрольным материалом, и применение других комплексных мер привели к повышению точности результатов и их высокой диагностической надежности. Для решения задач в области качества лабораторных исследований и дальнейшего совершенствования, наша лаборатория является участником международной системы внешней оценки качества (МСВОК) EQAS, организованный крупнейшей компанией «Bio-Rad Laboratories», США/Франция. По итогам годовых циклов с 2006 года по 2011 год получили 6 международных сертификатов качества Акридитационного комитета клинической патологии США. Сейчас мы продолжаем участие в МСВОК EQAS и расширили количество аналитов, подвергаемых контролю, участвуя в еще одной МСВОК RIQAS, организаторами которого является компания Randox, Англия. По итогам двух циклов по этой системе получили 2 сертификата качества. Участие в международной системе контроля качества дало нам возможность сравнения результатов нашей лаборатории с результатами лабораторий Европы, Америки и всего мира, и получить независимую документальную оценку правильности работы лаборатории.

Еще одним достижением по воспроизведению лабораторных методов исследования высокого качества явилась максимальная автоматизация технологического процесса, внедрение новейших технологий с применением современных анализаторов, отвечающих требованиям международных правил. Многочисленные исследования в мире показали, что широкое внедрение анализаторов в повседневную практику имеет ряд неоспоримых достоинств – высокое качество проводимых исследований, минимальный объем реагентов, высокая пропускная способность, хорошая воспроизводимость результатов. В арсенале нашей клиники мы имеем современные анализаторы, которые являются большим технологическим достижением в медицине, общепризнанные в Европе и в других развитых странах мира таких как «Рош Диагностикс» Германия, «Сисмекс», «Олимпус» Япония, «Био-Рад» США, «Бектон Дикенсон» США, «БекманУлтер» США и т.д., и мы имеем возможность использовать их в нашей работе. Сейчас мы используем в полном объеме все возможности этих анализаторов.

На сегодняшний день мы проводим около 500 видов различных лабораторных тестов. Среди них уникальные лабораторные тесты, которые мы применяем в последние годы, это – новые маркеры, только недавно ставшие доступными практической медицине.

Применяя иммуноферментные, хемилюминисцентные методы исследования определяем показатели диагностики эндокринных нарушений гипофиза, щитовидных, надпочечниковых и половых желез, репродуктивной дисфункции, злокачественных новообразований, сердечно-сосудистой патологий, вирусных гепатитов, различных инфекций, гельминтозов, анемии, гиповитаминозов и т.д.

Диагностика злокачественных новообразований проводится определением онкомаркеров рака молочной железы, яичников, желудка, кишечника, поджелудочной железы, головы, шеи, предстательной железы и злокачественного образования соединительнотканного происхождения; злокачественной меланомы, глиомы, высокодифференцированной нейробластомы, первичной гепатоцеллюлярной карциномы, герминомы.

При сердечно-сосудистой патологии используются определение маркера сердечной недостаточности – мозгового натрийуретического пептида (гормона, синтезируемого миоцитами предсердия и желудочка). Натрийуретические пептиды рассматриваются как потенциальные маркеры оценки функционального состояния сократительного потенциала сердечной мышцы, поэтому могут быть использованы для ранней диагностики сердечной недостаточности. Определяется также концентрация сердечных гликозидов дигоксина и дигитоксина, принимаемых пациентами при данной патологии. Для ранней диагностики инфаркта миокарда применяется чувствительный, специфичный и прогностический маркер повреждения миокарда – тропонин-Т и миоглобин.

В недавнем прошлом анемии устанавливали без полноценного обследования, опираясь только на данные периферической крови, в котором выявляется снижение содержания гемоглобина, эритроцитов на позднем этапе заболевания. Сегодня используя замечательные тесты определения уровня ферритина, трансферрина, растворимых трансферриновых рецепторов (sTfR), сывороточного железа, витамина B12 и фолиевой кислоты мы диагностируем вид анемии, стадию и степень тяжести заболевания, и мониторинг лечения анемии.

В наш век остеопороз стал актуальной проблемой у людей зрелого возраста и даже у молодых. Определяемые нами витамин Д3 и костные биомаркеры - бета-кросслапс и остеокальцин, будучи продуктами костного матрикса или клеток кости, являются индикаторами костного метаболизма. Они считаются важным диагностическим средством в оценке и лечении остеопороза.

Большую помощь при ранней диагностике и мониторинге сахарного диабета, кроме общепринятого определения уровня глюкозы в крови используется определение С-пептида, инсулина, гликозилированного гемоглобина и фруктозамина.

Как известно, атеросклероз остается одной из важнейших проблем современной медицины и поэтому исследование липидного обмена является обязательным условием для его диагностики. В нашей лаборатории проводится определение содержания холестерина, альфа-холестерина, бета-липопротеидов, триглицеридов и электрофоретическое разделение липопротеидов высокой, низкой и очень низкой плотности.

Вирусные гепатиты – глобально распространенная вирусная инфекция. Ежегодно в мире регистрируется около 50 млн. больных только с острым течением вирусных гепатитов В и С, большой процент которых, переходят в хронические формы. Для диагностики, прогноза развития, исхода инфекции, и для оценки эффективности лечения используются нами вирусспецифические антигенные, иммунологические маркеры вирусных гепатитов А, В, С, Д, Е. Генетические маркеры определяем методом ПЦР.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в настоящее время является наиболее совершенным диагностическим методом. ПЦР-метод позволяет обнаруживать патогенные для человека бактерии и вирусы даже в тех случаях, когда другими способами их выявление невозможно, особенно эффективен при диагностике трудно культивируемых, не культивируемых и персистирующих форм патогенных бактерий. В нашей практике данный метод широко применяется при диагностике более 30 различных инфекции, вызываемых вирусами и бактериями. Лечение больных под контролем ПЦР-метода позволяет снизить число осложнений, хронизаций и избежать рецидивов инфекции.

Современное развитие клинической медицины отмечено быстрым прогрессом сравнительно новой ее отрасли – клинической иммунологии. Мы для проведения исследования используем самый современный анализатор, основанный на проточной цитофлуориметрии. Исследование иммунного статуса организма проводим посредством оценки клеточного, гуморального звеньев иммунитета, системы фагоцитоза и т.д. Клеточное звено иммунитета стали исследовать с помощью субпопуляции иммунных клеток и кластеров дифференциации СД3, СД4, СД8, СД16, СД20, СД 23 и иммунологических цитокинов. Чрезвычайно широкая распространенность дефектов систем иммунитета в клинике различных заболеваний, а также зависимость возникновения, течения и исходов многих из них от состояния иммунного статуса организма указывают на актуальность проблемы и диктуют более широкое внедрение иммунологических исследований в практику. Бактериологическая лаборатория оснащена бактериологическим анализатором «Mini API», французской фирмы BioMerieux. После предварительного посева на питательные среды и роста возбудителей с помощью данного анализатора проводим идентификацию, а также устанавливаем типы штаммов и чувствительность к антибиотикам выделенных микроорганизмов. Стрипы для определения чувствительности к антибиотикам BioMerieux созданы с учетом последних наработок в области микробиологии. Отбор проведен на оснований последних данных о природной и приобретенной резистентности данной группы микроорганизмов, а также с учетом того, какими препаратами принято лечить те или иные заболевания в мировой медицинской практике.

И еще мне хотелось бы довести до читателей, что для диагностики различных видов коагулопатий, связанных с нарушением системы гемостаза, приводящих к развитию тромбозов или кровоточивости, используем исследование коагулограмм с помощью тестов, охватывающих все фазы свертывающей и противосвертывающей систем. В этой области лабораторной диагностики произошли важные перемены. Стали применять автоматизированные коагулометры. Проводится контроль свертывающей системы у больных, принимающих антикоагулянты прямого и непрямого действия с помощью стандартизованного протромбина с международным индексом чувствительности (МНО). Определяются все факторы внешнего и внутреннего путей активации свертывания. Используются специальные тесты для ранней диагностики тромбозов и других нарушений гемостаза, таких как, антитромбин, волчаночный антикоагулянт, Д-димер, растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК) и другие.

Мы широко используем определение белковых фракций с иммунотипированием для выявления патологических типов протеинограмм, соответствующие острым воспалительным процессам, подострым хроническим воспалениям, нефротическим симптомакомплексам, злокачественным новообразованиям, g и b - глобулиновым плазмацитозам, гепатитам и циррозам печени. В лаборатории в настоящее время для получения белковых фракций используется автоматическая система электрофореза MINICAP производства компании Sebia (Франция), которая работает по принципу капиллярного электрофореза – самого современного метода электрофоретических исследований. Разделение белков осуществляется под строгим температурным контролем в двух сверхтонких капиллярах, имеющих ряд преимуществ перед фракционированием на геле агарозы и бумаге, а именно: значительно меньше время, необходимое для разделения; высокая четкость разделения; малый объем исследуемого материала.

Таким образом, Центр лабораторной диагностики, оснащенный современным оборудованием специального назначения, предназначен на выявление нарушений во многих видах обменных процессов в организме человека. Абсолютное большинство лабораторно-диагностических исследований направлены на осуществление и выполнение своей главной функции – своевременное и полное обеспечение клинических служб качественной информацией, необходимой для принятия адекватных решений, и выбора эффективных методов и мероприятий лечения основных и сопутствующих заболеваний. Возможности нашей лаборатории, как показано, достаточно широки. При этом возможно выявление не только развившейся патологии, но и предпатологических состояний.

ЗАПАДНО-КАЗАХСТАНСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ МЕДИЦИНА И НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ ЕЕ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ

Ж.К. Ордабаев
д.м.н., профессор, руководитель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Западно-Казахстанского государственного медицинского университета имени Марата Оспанова, г. Актобе

С.С. Жумагулова
к.м.н., зав. курсом клинической лабораторной диагностики факультета усовершенствования врачей Западно-Казахстанского государственного медицинского университета имени Марата Оспанова, г. Актобе

Л.Н. Давлетова
к.м.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Западно-Казахстанского государственного медицинского университета имени Марата Оспанова, г. Актобе

Аннотация

Предпринята попытка анализа состояния лабораторной медицины в Западном Казахстане. Предлагаются пути ее совершенствования, а также улучшения деятельности ассоциации лабораторных работников.

An attempt was made to analyze the State of laboratory medicine in Western Kazakhstan. Suggests ways for its improvement as well as improving the activities of the Association of laboratory staff.

Ключевые слова: Западный Казахстан, лабораторная медицина, проблемы, совершенствование, централизация, кадры, оборудование.

Развитие отечественной лабораторной медицины требует пристального внимания и объединения усилий специалистов, искренне болеющих за дело, по сути патриотов. Отрадно констатировать успешное начало организационных мероприятий по совершенствованию лабораторной медицины РК: создание КАМЛД, соглашение о сотрудничестве и взаимодействии с РАМЛД, выход первого номера казахстанского журнала «Лабораторная медицина», организация I-ой Казахстанской международной научно-практической конференции и др. С удовлетворением осознаем и свой вклад в начальный этап становления современной лабораторной медицины, изложенный нами ранее в статьях и докладах.

В дополнение к этому нами проведен анализ наличия медицинских лабораторий в системах здравоохранения и санэпиднадзора в областях Западного Казахстана (Актюбинской, Западно-Казахстанской, Атырауской, Мангистауской). Вопреки ожиданию мы столкнулись с отсутствием простого списка лабораторий в департаментах здравоохранения и филиалах «Республиканского центра развития здравоохранения». Получить какие-то сведения удалось лишь через руководителей департаментов санэпиднадзора. Весьма приблизительные данные позволяют иметь только ориентировочную картину (таблица 1) и отражают качество работы внештатных специалистов лабораторного дела в областях и «внимание» к нему руководителей здравоохранения. Например, нам доподлинно известно о наличии 2-х патогистологических лабораторий в г. Актобе, централизованной баклаборатории, генетической и др., о которых в официальном ответе на наш запрос не сообщается.

Таблица 1. Наличие медицинских лабораторий в областях Западного Казахстана

№	Лаборатории	Области			
		Актюбинская (город/район)	Западно-Казахстанская (город/район)	Мангистауская (город/район)	Атырауская (город/район)
1	Всего мед.лабораторий, в том числе СЭН	131/43	185/38	48/18	117/20
2	Из них частных	25/4	9	-	-
3	клинических	60/37	26/77	8/8	18/5
4	биохимических	13/4	11/9	9/-	18/5
5	бактериологических	7/6	7/24	4/5	3/7
6	серологических	2/-	7/1	4/-	18/5
7	иммунологических	-	-	1/-	18/-
8	патогистологических	2/-	-	-	-
9	генетических	-	-	1/-	1/-
10	вирусологических	1/-	1/-	1/-	1/-

11	ПЦР	1/-	-	2/-	-
12	гематологических	-	-	4/-	18/5
13	гигиенических	2/-	1/13	2/-	1/7
14	токсикологических	1/-	-	1/-	1/0
15	иммунохроматографических	-	-	-	-
16	цитологические	2/-	7/1	-	-

Из представленных данных видно, что иммунологическая лаборатория имеется только в г. Актау, а 18 лабораторий в г. Атырау явный артефакт, либо к иммунологическим относят серологические лаборатории. Лишь по одной генетической и токсикологической лаборатории есть в г. Актау и Атырау. Ни в одной области нет лабораторий экспресс-диагностики и централизованных. По одной вирусологической лаборатории имеется в центрах санэпидэкспертизы, где проводится преимущественно серологическая диагностика вирусных инфекций. В отчетах практически нет упоминаний о ПЦР и ИФА диагностике, хотя известно об оснащении всех областей соответствующей аппаратурой. Только в Актюбинской области 5 ПЦР установок (из них 2 в райцентрах!).

Анализ недостоверных сведений дает соответствующую необъективную картину о состоянии лабораторной службы в Западном регионе, но позволяет выявить некоторые наиболее актуальные проблемы, главная из которых заключается в «сиротском положении» лабораторного дела. Тогда каково же состояние доказательной медицины? Порой в лабораториях нет самого необходимого: холодильников, центрифуг, микроскопов, своевременной поставки реактивов, сервисного обслуживания и др.

По официальным данным республика обеспечена современной лабораторной базой, однако реальное состояние лабораторного дела, судя даже по одному Западному региону, свидетельствует о множестве нерешенных проблем. На наш взгляд, целесообразно проведение следующих мероприятий:

1. Централизация лабораторной службы в областных центрах на базе частных или государственно-частных лабораторий, например, компании «Олимп». В крупных по территории областях создание межрайонных (на 3-4 района) лабораторий. Кадры и оборудование «старых» лабораторий сосредоточить в них, а также при необходимости иметь при клиниках мини-лаборатории для экспресс-диагностики (клиническая, биохимическая, бактериологическая, цитологическая, наркологическая и др.) со штатом 2-3 работника.

2. Подготовку, специализацию и усовершенствование кадров следует проводить не только в РК, но и в странах ближнего и дальнего зарубежья, сделав этот процесс легитимным. Идеальным было бы обучение врачей-лаборантов со студенческих лет в своеобразных школах крупных специалистов (М.Р. Рысулы, Б.В. Каральника, С.М. Плешковой, А.А. Шортанбаева, Н.М. Бисеновой и др.), чтобы молодые биологи, иммунологи, биохимики, бактериологи и др. были фанатами своего дела. Послевузовская подготовка через магистратуру и докторантуру позволила бы иметь плеяду отечественных высококвалифицированных специалистов. Думается, успешными лабораторными работниками сегодня могли бы быть и лица с высшим биологическим образованием. При этом особо следует сказать о кадрах клинических врачей-лаборантов (клинических микробиологов, биохимиков, фармакологов, иммунологов, патологов и др.). Кое-какие продвижения в этом вопросе выражаются в наличии штатов клинических эпидемиологов и фармакологов, коротких циклов лекций и практических занятий по клинической микробиологии и иммунологии для студентов 6-го курса некоторых факультетов. Эти робкие шаги едва приближают нас к международному уровню, когда указанные и другие специалисты параклинических дисциплин являются полноправными участниками диагностического, лечебного и профилактического процессов в клиниках. Кроме всего прочего их роль очевидна, например, в интерпретации лабораторных данных, выборе тактики обследования больного, прогнозировании болезни и т.д.

Аттестацию кадров, очевидно, должны проводить ведущие члены ассоциации в областях, а высшую категорию присваивать по согласованию с руководством республиканской ассоциации.

3. Обеспечение оборудованием, расходными материалами, реактивами и техническим обслуживанием аппаратуры сегодня является наиболее актуальными. Считаем, что на всей территории РК необходима ревизия оборудования для определения пригодности, соответствия сегодняшним требованиям и обеспеченности расходными материалами. В связи с централизацией лабораторий надо перераспределить оборудование в областных центрах в межрайонные и экспресс-диагностические лаборатории, часть передать в ветеринарные, экологические и другие лаборатории. Оборудование лабораторий должно постоянно обновляться в связи с мировыми тенденциями. Практика закупа расходных материалов и реактивов через тендеры, устраивая кого-то, вредит лабораторной службе, так как страдает качество материалов и своевременность их поставки. Если централизованные областные и районные лаборатории будут преимущественно частными, эта проблема решаема.

Большим тормозом в работе лабораторий является текущее техническое обслуживание аппаратуры. Нынешние конторы «Медтехники» надо полностью преобразовать, обеспечить грамотными специалистами и запасными частями к современной аппаратуре. Хорошо бы где-то готовить своих специалистов-медтехников и не ждать приезда представителей фирм (или наладить их экстренный приезд).

4. Аккредитация лабораторий остается большой мечтой, а сегодня нужна международная для соответствия ГОСО и международным стандартам качества. По нашим данным в медицинских лабораториях отсутствует такое понятие как «сличение результатов», когда одну пробу материала направляют в несколько лабораторий одного профиля и сравнивают результаты. Считаем, что в г. Актобе имеет большие шансы к международной аккредитации лаборатория «Олимп».

В заключении следует сказать о работе Казахстанской Ассоциации медицинской лабораторной диагностики. Положительно оценивая реализацию мечтаний неравнодушных работников лабораторной службы страны силами уважаемых алматинских и астанинских коллег, считаем уместным высказать некоторые замечания и пожелания («Дос жылатып айтады, қас адам күлдіріп айтады!»). Кстати, дружеская обоснованная критика должна быть обязательным атрибутом нашего нового союза (Ассоциации). Какова организационная структура ассоциации, где устав, кто организует работу в областях, кому и когда передавать взносы? Каков статус и взаимоотношения прежнего председателя областной ассоциации и внеш-

татного главного специалиста лабораторной службы департамента здравоохранения? Почему в областях нет информации об условиях участия в работе I-й Казахстанской международной конференции по лабораторной медицине. Каковы роль и место кафедр и их руководителей в общей системе лабораторного дела страны? Когда будут предприняты конкретные шаги по совершенствованию лабораторной службы со стороны МЗ РК?

Эти и другие вопросы просим обсудить на конференции, резолюцию (решения) и другие материалы выслать в областные центры.

sebia®
electrophoresis

minicap
автоматическая система
капиллярного электрофореза

MEDILAND

Мы работаем в Казахстане и работаем для Вас!
050031, г. Алматы, пр. Райымбека / ул. Сауна, 510-512/2 А
Тел:+7 (727) 238-08-55, 238-08-56, 238-08-57, факс: +7 (727) 238-01-64
e-mail: mail@mediland kz
www.mediland.kz

ЛАБОРАТОРИЯ СЕГОДНЯ: СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В СФЕРЕ ДИАГНОСТИКИ И СЕРВИСА*

Е.Чащихина

заведующая КДЛ «ИНВИТРО-Москва»
ООО «ИНВИТРО»

В повседневной деятельности практического врача-клинициста проблема постановки диагноза является одной из центральных. По данным статистических исследований, большинство врачебных ошибок допускается именно при первичной диагностике. Сегодня у практического врача имеются различные вспомогательные методы для постановки диагноза, однако в век современных медицинских технологий именно лабораторные методы исследования могут дать максимум информации, необходимой как для постановки диагноза, так и для своевременной профилактики заболевания и системной терапии его осложнений.

К сожалению, четкое взаимодействие врача-лаборанта и врача-терапевта обычно наталкивается на массу проблем и сложностей, чтобы избежать этих трудностей, лечащий врач зачастую оставляет невостребованным мощный лабораторный потенциал. О том, как свести к минимуму сложности взаимодействия терапевтов и лаборантов, и какие технологические решения реализованы для наиболее качественной и оперативной совместной работы, будет рассказано на примере Независимой лаборатории ИНВИТРО.

Рассмотрим по порядку возникающие проблемы.

Проблема № 1. Узкий спектр выполняемых исследований – необходимость работы с разными профильными лабораториями.

Решение. Современная организация лабораторных исследований базируется на создании крупных централизованных лабораторных центров. Централизация лабораторных исследований приводит к неизбежному увеличению рентабельности работы медицинского центра за счет снижения затрат на содержание собственной лаборатории. Во многих случаях для исключения ошибок в диагностике и получения качественного результата исследования гораздо выгоднее и удобнее воспользоваться услугами крупной централизованной лаборатории.

Независимая лаборатория ИНВИТРО – технологический комплекс с большим спектром исследований: биохимические и общеклинические анализы крови и мочи, изоиммунологические исследования, гормональные исследования; лабораторные тесты для оценки системы репродукции и мониторинга беременности определение концентрации онкомаркеров, маркеров аутоиммунных заболеваний; лабораторная диагностика остеопороза, лекарственный мониторинг; аллергодиагностика, диагностика инфекций, микробиологические анализы, цитологические и гистологические исследования и другие.

Таким образом, централизованный лабораторный комплекс ООО «ИНВИТРО» – это:

1. Обеспечение равнодоступности лечебных учреждений к новым современным и эффективным методам лабораторной диагностики.

2. Исключение расходов на оснащение сети плановых лабораторий лечебных учреждений.

3. Повышение качества медицинской помощи за счет своевременной лабораторной диагностики заболеваний.

4. Расширение спектра применяемых в клинической практике методов лабораторной диагностики.

Проблема № 2. Длительность выполнения исследований, задержки при получении результата.

Решение: внедрение в лабораторию достижений современных информационных технологий.

1. Лабораторная информационная система, позволяющая объединить все технологии в один согласованный комплекс, а также максимально автоматизировать процесс. Лабораторная информационная система предназначена для автоматизации и оптимизации деятельности клинико-диагностической лаборатории и внутрилабораторного управления качеством. Лабораторная информационная система - это комплекс программно-технических средств, который обеспечивает полный цикл лабораторных исследований - от приема направления до представления результатов, а также полную отчетность о работе лабораторного комплекса. Система ведет электронные журналы регистрации заказов на исследования, обеспечивает анализ работы лаборатории, поддерживает непосредственный обмен данными с автоматизированным лабораторным оборудованием. В систему встроен программный модуль контроля качества лабораторных исследований клинико-диагностической лаборатории, предназначенный для автоматизации сбора и хранения результатов контрольных измерений, построения контрольных карт, оценки результатов выполненных исследований.

В лаборатории ООО «ИНВИТРО» все технологические системы объединены в уникальную для России лабораторную информационную систему **Analytics,** специально адаптированную для ИНВИТРО шведской компанией CGM.

Это обеспечивает:

- быструю регистрацию;
- хранение результатов исследований в базе данных в течение многих лет и, при необходимости, моментальный поиск любого результата;
- возможность исполнения срочных анализов – полная готовность результатов основного спектра исследований за один день.

2. Вспомогательные программные продукты – дополнительные автоматизированные программные модули - дают возможность оперативной доставки результатов сразу после их получения и подтверждения:

- по факсу;
- электронной почте;
- по телефону.

Проблема № 3. Возможность ошибки на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах.

Решение: в лаборатории должна работать многоуровневая система контроля качества.

Комплексные ошибки лабораторной диагностики делятся на три типа: преаналитические (долабораторные) – связаны с взятием и передачей материала в лабораторию; аналитические (внутрилабораторные) – ошибки, связанные с самим процессам исследования; постаналитические (постлабораторные) – связаны с транспортировкой и интерпретацией результатов.

Для выявления и предотвращения недопустимых погрешностей, которые могут появиться на любом из перечисленных этапов выполнения лабораторных исследований, в ИНВИТРО создана система контроля качества. Она основана на принципах стандартизации и анализе результатов внутреннего и внешнего контроля качества. Что это означает?

- Работа только с первичной пробиркой позволяет избежать ошибок, возникающих при аликвотировании.

- Штрих-кодирование пробирок при регистрации заказа полностью исключает вероятность подмены или потери материала.

- Исследования проводятся на автоматических анализаторах с высокой степенью точности и надежности.

- Все результаты в ИНВИТРО проходят два уровня контроля и подтверждения – технологический и медицинский.

- Независимая лаборатория ИНВИТРО принимает участие в нескольких системах внешней оценки качества: ФСВОК (Россия); RIQAS - Randox (Великобритания), EQAS - BIO-Rad (США).

ИНВИТРО – первая российская лаборатория, сертифицированная по международному стандарту менеджмента лабораторного качества ИСО 15189:2003. Это означает, что все процедуры и этапы выполнения исследований жестким образом стандартизированы.

На сегодняшний день система менеджмента качества ООО «ИНВИТРО» соответствует требованиям ИСО 9001-2008 (ИСО 9001:2008) и ИСО 15189-2009 (ИСО 15189:2007).

Довольно часто перед практикующим врачом встает вопрос – в какую лабораторию отправить биоматериал пациента? На основании каких критериев сделать выбор в пользу той или иной лаборатории? Можно ли доверять лаборатории и как проверить правильность результатов? Ответ на все эти вопросы один: единственный реальный критерий, по которому можно оценить лабораторию – это не форма собственности (частная она или государственная), это – система контроля качества, стоящая за каждым выданным результатом. Независимо от формы собственности, современная лаборатория, наряду с лицензией, подтверждающей право деятельности, должна иметь многоуровневую систему контроля качества.

Проблема № 4. Недостаточный уровень сервиса при взятии биоматериала и доставке его в лабораторию.

Решение: развитая сетевая структура медицинских офисов, использование современных систем взятия материала, оперативность и продуманность логистических решений.

Сегодня под брендом ИНВИТРО работают более 300 медицинских офисов, 4 лаборатории на территории России и 1 лаборатория на территории Украины.

Для взятия крови используются вакуумные одноразовые системы Vacuette®, которые обеспечивают максимальную безопасность пациента, медперсонала во время процедуры взятия крови, так как конструкция систем полностью исключает контакт крови с окружающей средой. Преимуществами такой системы являются:

1. Быстрота взятия крови (5-10 секунд).

2. Возможность набрать кровь в две и более пробирки за очень короткий промежуток времени и без повторного введения иглы в вену.

3. Максимально точное соблюдение соотношения кровь-антикоагулянт.

4. Простота и надежность маркировки и транспортировки образцов.

Четкость и продуманность логистических решений. На данный момент биоматериал в лабораторию ООО «ИНВИТРО» доставляется при трех разных температурных режимах (-2-8°C, +37°C, -20°C), в зависимости от преаналитических требований. Создана система четкого контроля температурного режима: показания внутренних датчиков фиксируются каждые 5 минут, по окончании маршрута проводится всесторонний анализ температурной кривой для каждой конкретной доставки. Это позволяет выработать такой температурный режим доставки, который является оптимальным для данного вида биоматериала, и позволяет обеспечить полную сохранность всех аналитов.

Проблема № 5. Недостаточный уровень интерпретации полученных результатов.

Решение: Выдача бланка ответа в понятной стандартизированной форме, содержащей максимум необходимой информации. Возможность консультативного контакта со специалистом клинической лабораторной диагностики.

- Во многих медицинских офисах, работающих под брендом ИНВИТРО, можно воспользоваться услугой врача-консультанта.

- На корпоративном сайте компании в режиме онлайн специалисты ответят на вопросы.

- Специалисты ИНВИТРО проводят тематические семинары и конференции для врачей.

На сегодняшний день вышли 3 издания справочника «ИНВИТРО диагностика. Лабораторная диагностика». Кроме того, специалисты ИНВИТРО постоянно создают методические рекомендации, содержащие полную информацию по подготовке, проведению исследований, а также интерпретации результатов.

Проблема № 6. Отсутствие возможности введения новых методов исследования, низкая наукоемкость рутинных лабораторных структур.

Решение: активное внедрение в практику лаборатории актуальных диагностических алгоритмов; постоянный научный поиск:

- в 2010-2011 годах в лаборатории ООО «ИНВИТРО» апробированы, валидированы и введены для рутинного использования более 200 видов новых исследований;

- ведется постоянный технологический контроль качества используемых методик, при необходимости бесплатно проводятся дополнительные «подтверждающие исследования», например: подтверждающие диагностические тесты для всех положительных результатов по гепатиту В, С, а также ВИЧ-инфекции; исследование индекса авидности антител при получении положитель-

ного результата по ТОРЧ-инфекциям для установления давности инфицирования, что особенно важно при мониторинге беременности; оценка качественного состава гиперпролактинемий путём исследования уровня макропролактина.

Таким образом, лаборатория на сегодняшний день предоставляет клиницисту обширные диагностические и консультативные услуги, а также массу возможностей комфортных и оперативных сервисных решений. При совместном тесном сотрудничестве лаборатория – это мощный инструмент, позволяющий извлечь максимум информации, необходимой для правильной постановки диагноза, а также проведения своевременной профилактики, значительно повышающей качество жизни пациентов.

РОЛЬ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ДИАГНОСТИКЕ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

А.В. Иванов

к. фарм.н., руководитель представительства компании Helena Biosciences Europe в России и СНГ

Аннотация

Проведен анализ возможности использования электорофореза, в частности, иммунофиксационного методы его проведения, как наиболее точного и доступного метода для диагностики и мониторирования множественной миеломы.

Analysis of feasibility of èlektoroforeza, in particular, the immunofiksacionnogo methods, as the most accurate and accessible method for diagnosis and monitoring of multiple myeloma.

Ключевые слова: Электрофорез,моноклональные гаммапатии, М-градиент, иммунофиксационный электрофорез

Электрофорез принадлежит к базовым методам клинической биохимии и широко используется при исследовании нарушений белкового спектра сыворотки крови, мочи и цереброспинальной жидкости.

Основной принцип электрофоретического метода исследования заключается в том, что находящиеся в растворе молекулы, располагающие электрическим зарядом, под действием сил электрического поля смещаются в сторону противоположно заряженного электрода. Скорость миграции вещества в среде с одной и той же силой электрического поля, зависит от размера частиц и их электрического заряда. В случае белковых молекул, благодаря их амфотерным свойствам, направление и скорость смещения во многом зависит от pH среды, в которой происходит миграция. Заряд различных белков в растворах с одинаковым pH зависит от аминокислотного состава, так как диссоциация белковых цепей приводит к образованию групп, имеющих положительный или отрицательный заряд. Под влиянием сил электрического поля компоненты разгоняемой системы распределяются согласно их заряду, приобретая соответствующую скорость движения, т.е. происходит электрофоретическое разделение. Внедрение электрофоретических «носителей» привело к улучшению технологий и одновременно к упрощению фракционирования. В качестве «носителей» используются фильтровальная бумага, ацетат целлюлоза, различные гели (полиакриламид), агароза и др. При этом во время элекрофореза, наряду с разделением частиц согласно их зарядам, вступает в силу так называемый «молекулярно ситовой эффект», когда гелевая структура ведет себя по отношению к ионам как фильтр. Ионы, превышающие ее пористость не проходят или проходят очень медленно, а более мелкие ионы быстрее проникают через поры носителя. Таким образом, скорость передвижения зависит не только от заряда иона, но и от величины пор геля, формы пор, величины движущихся ионов, взаимодействия между матрицей геля и движущимися ионами (адсорбция и др.) [2].

История создания электрофореза начинается с 1807 года, когда профессор Московского Государственного Университета Ф. Рейс открыл такие явления, как электроосмос и электрофорез. Однако практическое использование этого процесса в биологии и медицине началось значительно позже и связано с именем лауреата нобелевской премии по химии Арне Тизелиусом, который в 30-е годы прошлого столетия разработал метод электрофореза в свободной жидкости и сконструировал прибор для электрофоретического разделения и анализа смеси белков методом свободных, или подвижных границ. Основным недостатком этого метода являлось выделение тепла при прохождении через жидкость электрического тока, это препятствовало четкому разделению фракций и приводило к размыванию границ между отдельными зонами. В 1940 г. Д. Филпот предложил использовать колонки с градиентом плотности буферных растворов, а в 50-е гг. метод был усовершенствован и создан прибор для электрофореза в градиенте плотности. Однако, метод был не совершенен, т.к. после отключения электрического тока, образовавшиеся в ходе электрофореза зоны – «расплывались». Последующие достижения в электрофорезе связаны со стабилизацией зон в твердой поддерживающей среде. Так в 1950 г. в качестве твердого носителя стали использовать фильтровальную бумагу, в 1955 г. было предложено использовать крахмал, а уже в 1957 г. Кон предложил использовать в качестве твердого носителя пленки ацетатцеллюлозы, которые до настоящего времени остаются одним из наиболее часто используемых носителей при клинических исследованиях.

Примерно в это же время был разработан метод, в котором в качестве основы использовалась агароза. В 1960 г. был разработан метод капиллярного электрофореза и лишь в 1989 г. был создан и внедрен в практику первый анализатор, в основе которого был заложен метод капиллярного электрофореза [3].

Основное значение электрофореза - обнаружение аномалий белкового профиля и, начиная с 60-х годов прошлого столетия, электрофорез белков сыворотки является популярным скрининговым методом лабораторных исследований. На сегодняшний день известно уже более 150 индивидуальных сывороточных белков и значительную часть из них можно определить количественно с помощью различных современных иммуноферментных, иммунохемилюминесцентных, нефелометрических и иммунотурбидиметрических методов. Но при всей информативности и доказательности этих анализов пока они в основном малодоступны из-за сравнительной дороговизны, а также требуют наличия в лаборатории дорогостоящего оборудования (нефелометр). Вместе с тем типовые сдвиги белкового состава сыворотки крови можно определить гораздо более доступным электрофоретическим методом, который к тому же позволяет «одним взглядом» оценить общую картину белкового спектра и

получить значимую диагностическую информацию [1]. Именно поэтому электрофоретический анализ белков сыворотки и сегодня остается наряду с биохимическим анализом крови популярным скрининговым методом исследования. Так, например, в США, Японии и некоторых странах западной Европы сохранились традиции определение белковых фракций сыворотки крови до проведения биохимического анализа крови. Однако чаще всего электрофорез белков назначают после биохимического и общеклинического анализа крови. Основные критерии для назначения электрофореза следующие:

- снижение концентрации общего белка в сыворотке крови менее 60 г/л
- увеличение концентрации общего белка в сыворотке крови более 85 г/л
- снижение концентрации альбумина в сыворотке крови менее 35 г/л
- увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) неясного генеза более 25 мм/ч

Электрофорез белков, помогает выявить заболевания печени и почек, иммунной системы, некоторые злокачественные новообразования (множественная миелома), острые и хронические инфекции, генетические поломки и др. Известен ряд своеобразных электрофоретических «синдромов» – типичных картин электрофореграмм, характерных для некоторых патологических состояний. Среди них можно отметить:

1. Моноклональные гаммапатии – это сборное наименование целого класса заболеваний, при котором происходит патологическая секреция аномальных, измененных по химическому строению, молекулярной массе или иммунологическим свойствам иммуноглобулинов одним клоном плазматических клеток или В-лимфоцитов. Эти иммуноглобулины затем нарушают функции тех или иных органов и систем, например, почек, что и приводит к развитию симптомов заболевания.
2. Острое воспаление с активацией системы комплемента и увеличением синтеза острофазных белков (a1-антитрипсина, гаптоглобина, фибриногена и др.). Оно проявляется увеличением доли a1- и a2-глобулинов и может быть подтверждено измерением СОЭ, исследованием концентрации С-реактивного белка, фибриногена (в динамике) и других острофазных белков.
3. Хроническое воспаление с усилением синтеза ряда острофазных белков, а также иммуноглобулинов; проявляется умеренным возрастанием a2- и b-глобулинов, повышением g-глобулинов и некоторым снижением альбумина. Подобные отклонения могут наблюдаться при хронических инфекциях, коллагенозах, аллергии, аутоиммунных процессах и при малигнизации.
4. Тяжелые заболевания печени сопровождаются снижением синтеза альбумина и аглобулинов, что и отражается на электрофореграммах. При хронических гепатитах и циррозах печени возрастает как относительное, так и абсолютное количество g-глобулинов (b- и g-фракции могут сливаться из-за накопления IgA), причем превышение g-глобулинов над альбуминами является весьма неблагоприятным прогностическим признаком.
5. Нефротический синдром сопровождается увеличением фильтрации белков в почках и селективной протеинурией – потерей с мочой большого количества альбумина и части низкомолекулярных глобулинов (a1-антитрипсина, трансферрина). При этом в печени усиливается синтез более крупных протеинов семейства a2-глобулинов (макроглобулин, апо-В), которые накапливаются в крови и формируют картину со значительным снижением альбумина и повышением a2-глобулинов.
6. Нарушение всасывания или значительная потеря белков возможна как при нефротическом синдроме, так и при массивных ожогах, синдроме Лаэлла, патологии желудочно-кишечного тракта и т.д. В последнем случае снижается абсолютное содержание общего белка и особенно альбумина, а на протеинограмме оказывается уменьшенной доля альбумина при относительно равномерном возрастании всех глобулинов. Введение белковых препаратов (иммуноглобулины, альбумин или плазма крови) в ходе лечения больных немедленно отражается на электрофоретической картине, что позволяет следить за динамикой потерь или выведения поступивших белков.
7. Тяжелый иммунодефицит врожденного или приобретенного генеза обычно сопровождается выраженным снижением g-глобулиновой фракции. При этом желательно провести дополнительное количественное определение IgG, IgA и IgM. [1]

В связи с тем, что клинический электрофорез является «золотым стандартом» для выявления моноклональных гаммапатий хотелось бы более подробно остановиться именно на диагностике этого заболевания.

Моноклональные гаммапатии – это группа злокачественных новообразований из клеток В-лимфоцитарного ряда, морфологическим субстратом которых являются клетки, продуцирующие моноклональный иммуноглобулин (парапротеин).

Количество впервые выявленных случаев множественной миеломы в США в 2010 году по данным Американского Противоракового Общества составило 20 180 случаев. Количество смертей от данного заболевания – составило 10 650. Средний возраст мужчин на момент постановки диагноза составил – 62 года (75% были старше 70 лет), женщин – 61 год (79% были старше 70 лет). Заболеваемость - 7,8 на 100 тыс. населения [4].

В Великобритании в 2007 году было зарегистрировано 4040 случаев впервые выявленной множественной миеломы. Заболеваемость 6,5 на 100 тыс. населения [5].

В Республике Беларусь (по данным Белорусского канцер-регистра (БКР) в 2007 г. зарегистрировано 39003 случая заболеваний с впервые установленным диагнозом, что соответствует регистрации в среднем 106,9 случаев заболевания в день.

В то же время в России в 2007 году по данным Вестника РОНЦ РАМН зарегистрировано всего лишь 2 372 первичных случаев множественной миеломы, заболеваемость составила 1,7 на 100 тыс. населения [6].

Столь существенная разница в заболеваемости множественной миеломы в США, странах Европы и России обусловлена отсутствием в нашей стране единого алгоритма в диагностике данного заболевания, отсутствия скрининговых программ.

Объем диагностических исследований при подозрении на множественную миелому, рекомендуемый Национальным Институтом Рака в США (National Comprehensive Cancer), наиболее влиятельной онкологической организацией в Америке включает следующие диагностические мероприятия:

- общий анализ крови (с обязательным подсчетом формулы крови);

- развернутый биохимический анализ крови (разделение белков сыворотки крови на фракции, креатинин, мочевина, электролиты, печеночные ферменты, уровень бета-2-микроглобулина);
- иммунофиксационный электрофорез (для установления типа парапротеинемии);
- электрофорез белков мочи и имунофиксация белков мочи (суточная моча) для диагностики болезни легких цепей.

Следует отметить, что ведущее значение в данных рекомендациях придается методу электрофореза и иммунофиксации белков сыворотки крови и мочи для выявления моноклонального компонента (парапротеина). Наличие в сыворотки крови или мочи парапротеина является наиболее частым и наиболее ранним лабораторным проявлением множественной миеломы. Для его выявления проводят электрофорез белков, а затем иммунофиксационный электрофорез сыворотки и мочи. При моноклональных гаммапатиях содержание гаммаглобулинов в сыворотке обычно возрастает, и на электрофореграмме в этой зоне обнаруживается острый пик, называемый М-градиентом (от слова «моноклональный»). Величина М-градиента отражает массу опухоли. М-градиент является надежным, и достаточно специфичным для массовых обследований опухолевым маркером. Также иммунофиксационный электрофорез показан также больным, у которых высока вероятность множественной миеломы, но обычный электрофорез не выявил никаких дополнительных полос.

Легкие цепи (каппа или лямбда) в сыворотке крови выявляются только методом иммунофиксациии при условии, что их концентрация превышает 10 норм. Поэтому всегда одновременно с электрофорезом сыворотки крови необходимо выполнять электрофорез белков мочи [7].

С учетом того, что множественная миелома – заболевание, которое в большинстве случаев диагностируется у людей старше 50 лет, и важности диагностики данного заболевания на ранней субклинической стадии (средняя продолжительность заболевания при I стадии – 62 мес., при III – 29 мес.), в США и ряде стран Европы существуют скрининговые программы для лиц старше 50 лет. Сущность таких программ заключается в ежегодном выполнении обязательного перечня скрининговых лабораторных исследований, в которых электрофорез белков сыворотки крови и мочи включен в один ряд с общим анализом крови, мочи и биохимическими исследованиями.

В ряде случаев М-градиент может наблюдаться у практически здоровых людей. В этих случаях речь идет о моноклональной гаммапатии неясного генеза. Данное состояние встречается намного чаще – у 1 % людей старше 50 лет и почти у 10 % старше 75 лет. Лечения данное состояние не требует, но требует постоянного наблюдения, так как у таких пациентов существует вероятность заболевания множественной миеломой. Наблюдение должно включать регулярные осмотры с измерением уровня М-градиента (парапротеина) в сыворотке методом электрофореза; при низком риске прогрессирования интервалы между осмотрами должны составлять от 6 до 12 месяцев.

За последние годы, достигнут существенный прогресс в лечении данного заболевания. Пятилетняя безрецидивная выживаемость увеличилась с 24 % в 1975 году до 35% в 2003 году [5]. Данные успехи можно объяснить с одной стороны, разработкой новых современных режимов полихимиотерапии, в ряде случаев с проведением высокодозной полихимиотерапий с алло-трансплантацией костного мозга, а с другой стороны, адекватной диагностикой и разработкой единых критериев оценки ответа на проводимую терапию, а так же мониторированием уровня концентрации парапротеина в сыворотке крови и/или мочи методом электрофореза с целью определения остаточной болезни.

Таким образом, в настоящее время ни у одной из исследовательских групп, занимающихся диагностикой и лечением множественной миеломы, не остается сомнений в чрезвычайной важности проведения анализа разделения белковых фракций сыворотки крови и проведения иммунофиксационного электрофореза, как единственного, наиболее точного и доступного метода для диагностики и мониторирования множественной миеломы.

Литература

1. Гильманов А.Ж., Саляхова Р.М. Электрофорез сывороточных белков: современные возможности анализа, http://med.com.ua
2. Сергеева Н.А./ Электрофорез в современном диагностическом процессе // Клин. лаб. диагн. – 1999. - № 2. - С. 25-32.
3. Шевченко О.П., Долгов В.В., Олефиренко Г.А./Электрофорез в клинической лаборатории. Белки сыворотки крови/ Из-во: «Триада», г. Тверь, 2006 г., 160 с.
4. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. et al. (2010) Cancer statistics, 2010. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 60, 277–300
5. Brenner H, Gondos A, Pulte D. Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma, Blood. 2008 Mar 1;111(5):2521-6.
6. Давыдов М. И., Аксель Е. М./ Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2007 г.// Вестник РОНЦ Том 20, №3 (77), прил .1, июль-сентябрь 2009 г., 158 с.
7. National Comprehensive Cancer Network/ Clinical Practice Guidelines in Oncology// Multiple Myeloma, version 1.2011, 52 pg.

ГЕПСИДИН: ОТКУДА ОН ВЗЯЛСЯ И ЗАЧЕМ НУЖЕН

Н.Р. Аблаев

профессор кафедры лабораторной диагностики и молекулярной медицины КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы

Аннотация

The Iron is an эссенциальным by element all alive organism. The Persons and other vertebral animals save the spares a ferric due to recyclic him from decaying red blood cells and other celluar element. The dayly loss ferric so small that can be filled by assimilation 1-2 mg food ferric. The General contents ferric in organism of the adult person forms 4-5, dayly need for eritropoiesis does not exceed 20-25 mg. Anemias of the chronic diseases are a gained complications of the many pathological processes and on its occupy one of leading places amongst the other anemia. To date molecular bases патогенеза this diseases studied it is not enough.

Ключевые слова: гепсидин, трансферрин, ферритин, ферропортин, гемохроматозы

Начало 21-го века ознаменовалось открытием нового гормона, регулирующего метаболизм железа в организме человека. Это гепсидин

Железо – незаменимый элемент для роста и выживания организмов, играет важную роль в многочисленных биологических функциях. Его участие особенно очевидно в транспорте кислорода гемоглобином, в синтезе ДНК (в составе коэнзима редуктазы рибонуклеотидов) и в активности оксидоредукции многочисленных митохондриальных энзимов.

Количество железа в организме чрезвычайно стабильно и определяется равновесием между поступлением и потерей этого металла.

Взрослый человек обладает приблизительно 4-4,5 г железа. Это обеспечивается за счет очень небольшой части поступающей с пищей и в основном за счет рециклирования железа, начиная с лизиса старых эритроцитов. В этом последнем механизме особенно задействованы макрофаги селезенки и красного костного мозга, и в меньшей мере, клетки Kupffer. От 60 до 70% железа входят в состав гемоглобина. Приблизительно 10% находится в миоглобине, цитохромах и ферментах, содержащих железо. Остальное железо переходит в запас железа или в форме ферритина (легко мобилизируемая форма резерва) или в форме гемосидерина (трудно мобилизуемая форма резерва). Плазматический транспорт включает трансферритиновое железо и составляет приблизительно 1% железа от общего объема организма.

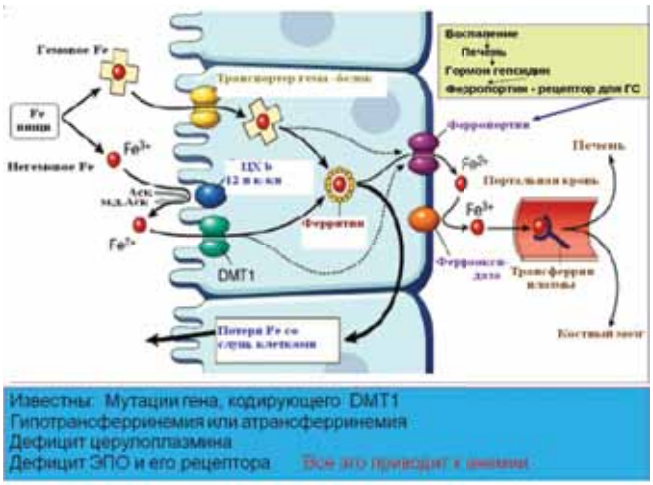
Ежедневные потери железа - 1-2 мг в день. В основном они осуществляются через пищеварительный тракт: в виде десквамации эпителиальных клеток кишечника, микрокровотечений и потери с желчью. Железо также теряется и при десквамации эпителиальных клеток кожи, и в меньшей степени с мочой. Компенсация этих потерь происходит путем абсорбции железа из пищи. Регуляция этой абсорбции находится под воздействием общего содержания железа в организме, эритропоетической активности, гипоксии и содержания железа в пище и природы питания, а в последнее время очень важное значение в данном процессе придается гормону гепсидину.

Энтероциты ворсинок двенадцатиперстной кишки и проксимальной части jejunum ответственны почти за полную абсорбцию геминического и негеминического железа. Эти энтероциты являются результатом созревания и миграции мультипотентных исходных клеток, располагающиеся в дуоденальных криптах. Чтобы попасть из интестинального просвета в плазму, железо должно пересечь апикальную мембрану, сам энтероцит, а затем базолатеральную мембрану, т.е. путь железа не просто

Геминическое железо эндоцитируется с молекулой гема после сливания с потен-циальным рецептором, называемым гемм переносящим белком (HTP). Затем железо освобождается в энтероците после отторжения молекулы гема гем-оксигеназой.

Что касается абсорбции железа не геминического (неорганического, окисленного) на уровне апикального полюса энтероцита, то наиболее вероятный механизм - это участие транспортера дивалентного катиона DMT1. В этом случае атомы феррического железа (окисленного= трехвалентного железа), поступившие с пищей, сначала редуцируются в атомы двухвалентного железа ферриредуктазой, называемой Cybrd1, затем захватыва-ются транспортером DMT1 (трехвалентные атомы металлов через этот канал пройти не способны).

Рис. 1. Механизм транспорта атомов железа через энтероциты



Пояснения к рисунку: DMT1 – транспортер двухвалентных металлов (белок),Донором электронов для восстановления атомов железа чаще всего служит аскорбиновая кислота,

электроны от которой отщепляются и переносятся на Fe^{3+} ферриредуктазой. На базолатеральной поверхности энтероцитов локализуется белковый канал ферропортин, который выпускает атомы железа из клетки и который служит своего рода рецептором для гепсидина. При выходе из клетки атом Fe^{2+} снова окисляется до Fe^{3+} белком гефестином (феррооксидазой). У человека эту функцию почти полностью выполняет белок острой фазы –церулоплазмин. Окисленное железо (2 атома) связывается с трансферрином и доставляется в костный мозг и другие ткани.

Потенциальная токсичность этого металла (восстановленное железо превращает часть молекулярного кислорода в супероксидный радикал) предполагает, что он находится в комплексе с мелкими молекулами или внутриклеточными протеинами шаперонами. После захвата железо может быть направлено в сторону ферритина, где протеины энтероцита могут использовать его в качестве неорганического кофактора, или к базальному полюсу энтероцита. В первом случае абсорбированное железо будет утрачено в процессе естественной десквамации энтероцитов, тогда как во втором, оно будет находиться в резерве, чтобы быть направленным в общую циркуляцию Процесс высвобождения железа в сторону общей циркуляции включает, по меньшей мере, два протеина, которые были идентифицированы совсем недавно.

Экспортирует железо из энтероцитов в кровь. Присутствует в макрофагах, 12-перстной кишке, печени и плаценте. Он встречается только у позвоночных. По последним данным, ферропортин служит также рецептором для гепсидина. После прикрепления гепсидина – гормона к ферропортину весь комплекс поступает в цитоплазму энтероцита и разру-шается, и прежде всего белок- канал ферропортин, а, возможно, и гепсидин. В результате, базолатеральная мембрана лишается канала для выхода железа в сторону крови (обычная мембрана клеток вообще не пропускает катионы железа ни в ту, ни в другую сторону).

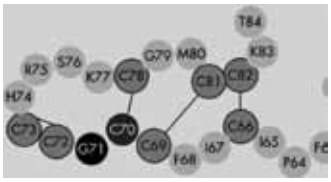
Рис.2. К механизму действия гепсидина

Рис.3. Механизм стимуляции секреции гепсидина и потенциальная важность регуляции уровня железа для организма

При отсутствии гепсидина или при незначительных его (базальных) количествах Fe^{2+} выходит из энтероцита и тут же под влиянием фермента гефестина (феррооксидазы) окисляется до Fe^{3+}, которое подхватывается трансферрином (одна молекула трансферрина связывает два атома окисленного железа).

Гепсидин синтезируется в печени. Молекула активного гормона состоит из 25 аминокислотных остатков и содержит 4 дисульфидных связей

Рис. 4. Аминокислотный состав и структура гепсидина



Гепсидин блокирует поступление железа в плазму. Блокирует экспорт железа из макрофагов, содержащих Fe отмирающих эритроцитов. Таким образом, гепсидин связывается с ферропортином и индуцирует его интернализацию (перемещение внутрь клетки) и далее его деградацию. С помощью такого механизма гепсидин регулирует выход железа из клеток 12-перстной кишки в плазму и тем самым обусловливает распределение железа в организме. Когда гепсидина много в крови (воспаление), он вызывает анемию, когда его мало, конечно, при наличии нормальных ферропортинов, развивается гемохроматоз (избыточное депонирование железа во многих тканях).

Название гепсидин происходит из следующих компонентов*: ген –от гепар (печень), окончание сидин указывает на его антибактериальные свойства.*

Первоначально (2000г) гепсидин считался одним из новых белков острой фазы воспа-ления. Но через год было обнаружено, что он синтезируется в печени и по всем параметрам должен быть отнесен к гормонам. Таковым он сейчас и рассматривается.

Дисрегуляция гепсидина приводит к ряду патологий. При анемии воспаления усилии-вается секреция гепсидина печенью, гепсидин-секретирующими опухолями, продукция гепсидина при этом является очень вы-

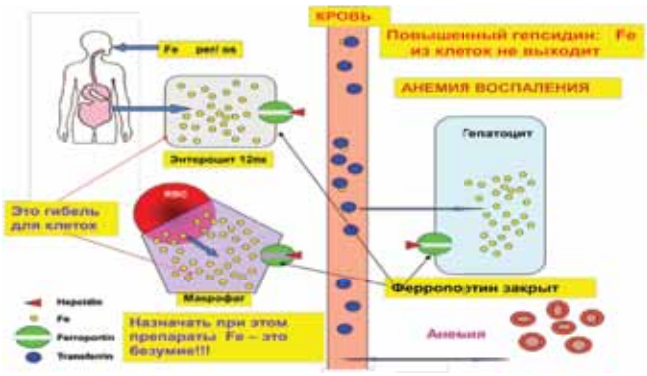
сокой, а концентрация железа в плазме становится очень низкой, что неминуемо ведет в анемии. При врожденном гемохроматозе и железо-обусловленных анемиях продукция гепсидина неадекватно низкая, поэтому абсорбция и высвобождение железа из соответствующих клеток очень высокие. Концентрация железа в крови также очень высокая. Это приводит к перенасыщению тканей железом, следовательно, в таких тканях налицо железотоксичность (гемохроматоз).

Вполне возможно, что появятся (уже появляются) данные, говорящие о том, что гепсидин имеет не только печеночное происхождение, но производится также рядом других органов и тканей(желудке, сердце). Такова научная история многих открытий: гормональное соединение, выделенное из гипоталамуса или из другой железы, через некоторое время обнаруживается в достаточно эффективных количествах в поджелудочной железе, в клетках, разбросанных в различных отделах ЖКТ.

Механизм развития анемии при хронических воспалительных заболеваниях выглядит следующим образом (см. рис.5.):

- в ответ на липополисахарид бактериальной стенки (ЛПС), а также на секре-тируемые фагоцитами провоспалительные интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6), гамма-интер-феррон, TNF- альфа происходит притупление эритропоэтинового ответа, снижение ответа эритроидных тканей на ЭПО, уменьшается поставка железа из РЭС, повышается содер-жание ферритина (железа) внутри клеток, уменьшается уровень железа в трансферрине и, следовательно, повышается коэффициент насыщения трансферрина, снижается абсорбция железа из ЖКТ. Причинами указанных явлений служат:
- воспаление, некроз тканей, инфекции, - неоплазия, - различная патология сердечно-сосудистой системы, инфаркт миокарда и др.

Рис. 5. Механизм развития гипоферремии (и анемии) при гипергепсидинемии (хроническое воспаление)



Избыточное поступление железа в органы и ткани вызывает гемохроматоз. Большинство форм врожденного гемохроматоза являются следствием генетического дефекта гепсидин- регулирующих белков HFE, рецептора трансферрина - 2, гемоювелина или самого гепсидина. При всех указанных случаях продукция гепсидина становится очень низкой, и потеря контроля со стороны гепсидина приводит к беспрерывному всасыванию железа из продуктов питания, насыщению трансферрина плазмы, токсически высокому отложению железа в печени и других органах.

Железо, поступающее из энтероцитов (5%) и из мононуклеарных макрофагов (95%), в нормальных условиях в основном переводится в костный мозг, где оно необходимо для синтеза гемоглобина. Фракция железа, не предназначенная для костного мозга, делится между другими различными местами утилизации и местами накопления представленными макрофагами, но в основном, гепатоцитами, особенно чувствии-тельными к перегрузкам железом.

Железо транспортируется в плазму в основном в форме железа связанного с трансферрином. Комплекс железо-трансферрин затем захватывается рецептором-1 трансферрина (RTf1), присутствующим в различных органах, в частности печени и эритропоетических клетках. Во время перегрузок железа появляется особая биохимическая форма железа. Речь идет о железе не связанном с трансферрином, особенностью которого в отличие от железа, связанного с трансферрином, является преимущество захвата печенью. Эта форма железа, способного генерировать свободные радикалы, не поддается любой из известных форм регуляции и в весьма значительной степени способствует осложнениям, связанным с перегрузками железом.

Высокий уровень железа и снижение уровня кислорода тормозят секрецию гепсидина. Воспалительные (хронические) заболевания стимулируют секрецию фагоцитами провоспалительных цитокинов, которые вызывают синтез и секрецию печенью гормона гепсидина (он же один из белков острой фазы воспаления) иснижение синтеза эритропоэтина. Эритропоэтин (ЭПО) должен запустить процесс формирования клеток крови из плюрипотентных стволовых клеток. Поскольку гепсидин при этом разными путями уменьшает уровень железа в крови (путем снижения абсорбции, транспорта и биодоступности) и трансферрин не доставляет железо в костный мозг, то включение атома железа в протопорфирин не происходит, не сформировавшиеся клетки крови подвергаются апоптозу. В результате развивается анемия.

Рис. 6. Апоптоз незавершенных форм эритроцитов при хронической патологии

Пояснение к рисунку: гепсидин как лабораторный тест интересен еще и с других точек зрения:

- во-первых, мутации и другие воздействия на печеночные гены, кодирующие гепсидин (это, как правило, врожденные дефекты), разрушение самих гепатоцитов приводят к неспособности печени синтезировать и секретировать нужное количество гепсидина, - тогда нарушается возможность регуляции ферремии, что неминуемо приводит к избыточному отложению железа в различных органах и тканях (см

рис ниже), вследствие чего развивается гемохроматоз 1 типа(ювенильный гемохроматоз;

- во-вторых ген, кодирующий ферропортин, оказывается, тоже может стать дефектным, т.е. неспособным взаимодействовать с гормоном гепсидином, выход железа из соответствующих клеток не контролируется, развивается гиперферремия с развитием гемохроматоза 2 типа.

Если гемохроматоз1 типа является гепсидин-зависимым и может быть излеченным путем введения экзогенного гепсидина (пока гепсидин как лекарственное средство не существует, но скоро должен доступным), то для лечения гемохроматоза 2 типа (гепси-дин-независимый тип) должны подбираться другие методы терапии.

Имеются основания предполагать, гемохроматозы чаще всего не диагностируются. Повсеместное внедрение в лабораторную практику исследования гепсидина (прогепси-дина) поможет, безусловно, исправить положение.

Рис.7. Гепсидин-зависимые и гепсидин-независимые типы гемохроматозов

Рис. 8. Поражение различных органов при гемохроматозе

Как изменяется работа гена HFE в различных условиях?

Гемохроматоз вызывается мутациями в гене HFE. Исследователи идентифицировали более 20 мутаций в гене HFE, которые вызывают гемохроматоз 1 типа. Эти мутации изменяют размер белка или его 3-мерную структуру. В результате белок не может функционировать правильно. Характерна замена аминокислоты цистеина на тирозин в позиции 282 в белковой цепи (описывается как C282Y или Cys282Tyr). Другая мутация вызывает замену гистидина на аспарагиновую кислоту в положении 63 (описывается как H63D или His63Asp). В результате таких замен измененный белок не удерживается на поверхности клеток и не взаимодействует с рецептором на клеточной поверхности, = рецептором для трансферрина. Рецептор трансферрина играет ключевую роль в регули-ровании количества железа, которое проникает в клетки. Когда же белок HFE не связы-вается с рецептором трансферрина, слишком много железа поступает в организм, проходя бесконтрольно через стенку тонкого кишечника. Такая чрезмерная абсорбция железа (перегрузка организма железом) обусловливает характеристики данного заболевания Порфирия – повышенный риск вследствие мутаций в гене HFE

Мутации в гене HFE, которые вызывают гемохроматоз, обусловливают также особую форму порфирии, называемой *porphyria cutanea tarda*.

Цитогенетическая локация гена HFE: 6p21.3

Молекулярная локация хромосомы 6: пары оснований 26,195,426 to 26,205,037

Заключение

Представление о молекулярных механизмах контроля гомеостаза железа быстро углубляется за последние годы благодаря методам молекулярной генетики и идентификации большого количества протеинов, участвующих в метаболизме этого металла. Анализ экспериментальных моделей (носителей естественных мутаций или экспериментальных) и изучение заболеваний человека, связанных с нарушениями метаболизма железа, также внесли свою лепту. Они позволили выявить комплексность биохимических процессов, задействованных в поддержании баланса железа в организме, хотя и без достаточного понимания всех механизмов. Имеются многочисленные аргументы в пользу того, что интестинальная гиперабсорбция железа не является единственной причиной генетического гемохроматоза, но что макрофаги, как и клетки печени, по меньшей мере, играют такую же важную роль, как и энтероциты в развитии этой наследственной перегрузки железом.

Традиционная система контроля ЖДА органами ВОЗ заставляет лечащих врачей даже на основе однократного исследования уровня гемоглобина и обнаружения при этом еще совсем неясной природы анемии назначать больным препараты железа. Но, как показывает практика, ферротерапия дает положительный эффект лишь в половине случаем, а на остальную половину больных с "ЖДА" препараты железа оказывают отрицательный эффект, вплоть до генерализации воспалительного процесса. Настало время точно выяснять, что же у конкретного больного - ЖДА или АХЗ. Если больной страдает анемией воспаления (об этом опытный врач подумает, если в общем анализе крови, крови гипогемоглобинемии, отмечаются повышенная СОЭ, лейкоцитоз, повышенный уровень СРБ, -т.е. маркеров воспаления), то необходимо вначале убрать воспаление. При таком подходе повторные анализы крови укажут на динамику гемоглобинемии, а возможно, и на нормализацию гемоглобина. Больной, таким образом, будет избавлен от негативного действия продолжительной железозации.

Новый этап исследований этого метаболизма состоит в дальнейшем изучении экспрессии совокупности генов различных типов клеток с помощью нанотехнологий в различных условиях перегрузки или недостатка железа.

Разумеется, приведенными здесь фактами не ограничивается сущность всех серьезных "железных " проблем.. Читатель по ходу знакомства с данным материалом, на-

верное, обратил внимание на большую группу белков, задействованных в метаболизме железа. Если учесть, что эти белки кодируются генами, которые, к сожалению, обладают способ-ностью подвергаться различным мутациям и производить дефектные белки, то становит-ся понятным существование множество форм анемий, которые не могут быть излечены только приемами железа.

К сказанному следует также добавить, что содержание гепсидина в крови опреде-лятся с помощью метода ИФА. Изучение изменений данного показателя, совместно с исследованиями разных параметров эритроцитов, уровня гемоглобина в крови, а также ряда белков острой фазы воспаления внесет существенный вклад в развитие гематологии, заставит клиницистов учитывать возможности развития анемии у больных с хроничес-кими заболеваниями, которые к тому же сопровождаются оксидативным стрессом, учитывать все при терапии данной категории патологии у взрослых и детей.

У здоровых добровольцев, по данным Tomas Ganz, Gordana Olbina, Domenico Girelli, Elizabeta Nemeth, and Mark Westerman(Blood, 15 November 2008, Vol. 112, No. 10, pp. 4292-4297), концентрация гепсидина в крови у мужчин колеблется в пределах 29 - 254 ng/mL (n = 65), а у женщин несколько ниже 17 - 286 ng/mL (n = 49), ($P < .001$). Самая низкая концентрация данного гормона составляла 5 ng/mL. Уровень гепсидина в крови коррелирует с содержанием ферритина. У больных с ЖДА концентрация гепсидина в крови была очень низкой. У больных с хроническим воспалением (C-reactive protein > 10 mg/dL), миеломой, хронической почечной патологией, наоборот, концентрация гепсидина была очень высокой. По мнению авторов, измерение уровня гепсидина в крови является очень перспективным маркером, особенно при затруднениях отделения физиологических изменений от патологических нарушений, а также для выявления генетических дефектов, в том числе в случаях ювенильного гемохроматоза, уточнения этиологии заболеваний, обусловленных нарушением метаболизма железа.

Литература

1. E.Cadet, M. Gadenne, D. Capront, J. Rochette / Donnes recentes sur metabolisme du fer: un etat de transition / La revue de medecine interne 26 (2005) 315-324
2. Park, CH; Valore, EV; Waring, AJ; Ganz, T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem. 2001;276:7806–10.
3. Pigeon, C; Ilyin, G; Courselaud, B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. J Biol Chem. 2001;276:7811–9.
4. Ganz, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. Blood. 2003;102:783–8.
5. Roetto, A; Papanikolaou, G; Politou, M, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. Nat Genet. 2003;33:21–2.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ ПРИ ПОМОЩИ INTEGRAL SYSTEM YEASTS PLUS В ДИАГНОСТИКЕ КАНДИДОЗОВ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Д.Ч. Уразбаева, С.К. Бисимбаева, Н.В. Калина, Б.Д. Бекибаева

АО «Республиканский диагностический центр», г. Астана

Аннотация

В результате проведенного микробиологического исследования биоматериала, взятого при заболеваниях ЛОР-органов проведено определение спектра дрожжевых грибов и выявление доминирующих видов с использованием диагностической системы «Integral system yeasts plus».

Microbiological studies of biomaterial made at diseases held definition of yeast fungi and identification of dominant species using diagnostic system «Integral system yeasts plus.

Ключевые слова: кандидоз верхних дыхательных путей, Integral system yeasts plus, идентификация и определение антимикотикочувствительности

Введение. Заболевания, вызываемые дрожжевыми грибами, представляют одну из проблем современной медицины. В настоящее время выявлен ряд факторов, предрасполагающих к возникновению кандидоза верхних дыхательных путей (ВДП) у взрослых и детей, но основными являются предшествующая длительная терапия антибактериальными антибиотиками, системные и другие заболевания слизистых оболочек, сопровождающиеся их повреждением [2, 3].

Дрожжевые грибы относятся к оппортунистическим микроорганизмам. Они обычно слабовирулентны и не способны вызывать инвазивные микозы у пациентов без нарушения защитных барьерных функций организма [1].

Проблема выявления и лечения кандидозов в оториноларингологии приобретает всё большее значение по ряду причин: широкое распространение, более тяжелое течение данной патологии, изменение спектра микобиоты и рост резистентности микромицетов к антимикотическим препаратам [5, 6].

Для эффективной терапии микозов ВДП необходимым условием является проведение видовой идентификации и определение чувствительности возбудителей к противогрибковым препаратам [4, 6].

Цель работы. Целью нашего исследования является определение спектра дрожжевых грибов, выделяемых из клинических материалов от пациентов с заболеваниями ВДП, выявление доминирующих видов.

Материалы и методы исследования. Нами произведено микробиологическое обследование 1525 пациентов с заболеваниями ВДП, находившихся на обследовании и лечении в АО «Республиканский диагностический центр» (АО «РДЦ»), г. Астаны в 2010-2011гг. Забор материала производился до начала антибактериальной и антимикотической терапии. Транспортировка осуществлялась в течение 2-3 часов в пробирке с транспортной средой. Для выделения грибов из патологических материалов использовали стандартные методики микробиологического исследования. После получения чистой дрожжевой культуры на агаре Сабуро проводили дальнейшую идентификацию с использованием системы «Integral system yeasts plus» (производство «Liofilchem s.r.l.», Италия), представляющая собой 24 луночную систему, содержащую высушенные биохимические и антимикотические субстраты для детекции наиболее клинически важных дрожжей (рис.1).

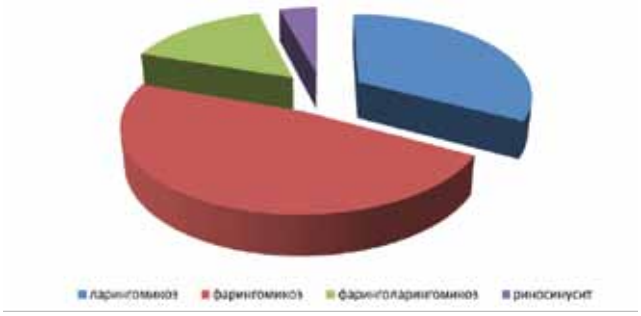
Рис. 1. Выделение Cryptococcus laurentii на Integral system yeasts plus (производство «Liofilchem s.r.l.», Италия)

Integral system yeasts plus – одноразовая система, которая используется только для in vitro диагностики. Используемая система позволяет определить 31 вид дрожжевых грибов. Детекция основывается на реакциях ассимиляции сахаров, которые интерпретируются оценкой изменения цвета в лунках. В тестах используется 12 биохимических тестов, которые разделены на 4 группы, содержащих по 3 теста и каждый тест определяется позитивными значениями 1, 2, 4. Комбинация позитивных и негативных реакций позволяет сформировать цифровой код, которая дает возможность идентифицировать исследуемые дрожжи с помощью прилагаемой таблицы кодов.

Помимо этого определяли наличие образования ростковых трубок и морфологию (образование гиф, псевдогиф, бластоконидий, хламидоспор, артроспор) на рисовом агаре.

4.Результаты и обсуждение.Микробиологическое исследование биоматериала, взятого при заболеваниях ЛОР органов показало, что из 1525 проб в 1403 случаях (92,0%) результаты положительны. У 122 обследованных (8,0%) выделялись дрожжевые грибы. Больные распределены по нозологическим формам следующим образом: ларингомикоз – 40 (32,8%), фарингомикоз – 58 (47,5%), фаринголарингомикоз – 19 (15,6%), грибковый риносинусит – 5 (4,1%) (рисунок 2).

Рис. 2. Нозологическая структура микозов ВДП



Доминирующими видами при ларинго- и фарингомикозах являются *Candida albicans*. Причиной грибкового риносинусита явился Trichosporon pullulans.

Часто инфекция была вызвана разными штаммами C. albicans в сочетании с различными бактериями. Большинство этих изолятов составили C. famata, C. tropicalis и C. parapsilosis, причем доля видов, не относящихся к C. albicans, доходила в среднем до 57%.

Случаи выявления других родов дрожжей, таких как Cryptococcus и Saccaharomyces в изучаемой популяции составили 13,2% и 10,0% соответственно. У одного пациента причиной микоза явилась Rodotorula rubra. Основным возбудителем микозов явилась C. albicans, которую обнаружили у 47,0% пациентов.

Таким образом, использование тест-метода в диагностике микозов ЛОР органов позволяет одновременно проводить идентификацию и определение антимикотикочувствительности выделенных грибов, что сокращает сроки выдачи результата. Кроме того, информация, получаемая при тестировании дрожжевых грибов, может быть использована для уточнения таксономического положения микроорганизмов.

Выводы:

1. Integral system yeasts plus является современным доступным стандартным методом идентификации дрожжевых грибов, которую необходимо внедрить в практику лабораторной клинической микробиологии.

2. При фаринголарингомикозах ведущим этиологическим агентом в нашем регионе является *C.albicans*.

Литература

1. Тастанбекова Л.К. Видовой спектр и биологические свойства плесневых грибов при микозах ЛОР-органов: автореф. дис ...канд.мед.наук: 03.00.07/ Л.К. Тастанбекова, Казах. нац. мед. ун-т. - Алматы,2004.- 29с.

2. Буркутбаева Т.Н. Диагностика и лечение микотических поражений верхних дыхательных путей, вызванных мицелиальными микромицетами/ Т.Н. Буркутбаева // Рос. оториноларингология. – 2005.-№3.- С.40-43.

Профлорцентр РМАПО [Электронный ресурс] / Микотическая инфекция и антифунгальный иммунитет при оториноларингологической патологии / Арефьева Н.А. [и др.] Режим доступа: http:// - http://www.lorcentr.ru/ - Дата доступа: 05.01.2009

Vennewald I., Hencer M., Klemm E., Seebacher C. Fungal colonization of paranasal sinuses // Mycoses. – 1999. -- № 42, Suppl.2. – P.33-36.

Аравийский, Р.А Диагностика микозов/ Р.А. Аравийский, Н.Н. Климко, Н.В.Васильева – СПб: Издательский дом СПбМАПО, 2004. – 186с.

Елинов, Н.П. Аспергиллёзная инфекция: подходы к диагностике и лечению/ Н.П. Елинов, В.С. Митрофанов, Р.М. Чернопятова // Проблемы медицинской микологии. – 2002. – Т.4.-№1.-С.1-14.

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ HELICOBACTER PYLORI С РАЗВИТИЕМ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДКА

Кулмамбетова Г.Н.
PhD, с.н.с., Национальный центр биотехнологии РК, г. Астана

Иманбекова М.К.
магистрант, лаборант,
Национальный центр биотехнологии РК, г. Астана

Сукашев А.Т.
врач, Национальный научный медицинский центр, г. Астана

Логвиненко А.А.
заведующий отделением эндоскопии,
Национальный научный медицинский центр, г. Астана

Раманкулов Е.М.
PhD, генеральный директор,
Национальный центр биотехнологии РК, г. Астана

Аннотация

Интенсивное изучение физиологии H.pylori и его факторов вирулентности было вызвано тем фактом, что у 80% больных, страдающих раком желудка, в анамнезе была зафиксирована инфекция H.pylori. В настоящий момент известно, что желудок человека может быть одновременно колонизирован несколькими штаммами H.pylori, и более того, один и тот же штамм может подвергаться различным генетическим модификациям, особенно под воздействием антибактериальных и других лекарственных препаратов. Соответственно, в случае разработки диагностических систем, направленных на выявление факторов вирулентности H.pylori у конкретного пациента наиболее важным оказывается не только подтверждение факта присутствия у пациента H.pylori и его генетическая характеристика, а анализ факторов вирулентности у возбудителя, выделенного непосредственно из очага поражения.

Intensive study of the physiology of h. pylori virulence factors and due to the fact that 80% of patients with a history of stomach cancer, was fixed by h. pylori infection. At this moment it is known that the stomach can be both colonized several strains of h. pylori, and Moreover, the same strain can be subjected to various genetic modifications, especially under the influence of antibacterial and other medications. Accordingly, in the case of development of diagnostic systems to identify virulence factors of h. pylori in their patients the most important is not only a confirmation of the presence of a patient may have h. pylori and its genetic characteristics and analysis of virulence in the activator, selected directly from the hotbed of defeat.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori,* факторы вирулентности, ген, аллель.

Helicobacter pylori – грамотрицательная, микроаэрофильная бактерия, колонизирующая слизистую оболочку желудка и ассоциированная с такими заболеваниями человека, как атрофический гастрит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, аденокарцинома или экстранодальная В-клеточная MALT-лимфома Хомерики (2001).

H. pylori имеет достаточно широкий набор факторов патогенности и вирулентности, большинство из которых служат для адаптации к условиям паразитизма этого микроорганизма в желудке, обеспечивая ему возможность выживания в кислой среде желудочного содержимого и колонизации слизистой оболочки желудка Ющук (2006), Кудрявцева (2004). Данные факторы условно можно разделить на факторы, способствующие колонизации (подвижность микроорганизма, наличие адгезинов и уреазы), факторы, способствующие персистенции (ферменты, продукты метаболизма, липополисахариды, способность образовывать кокковые формы) и факторы, собственно провоцирующие воспалительные процессы слизистой оболочки (провоспалительные факторы, фосфолипазы, липополисахариды, вакуолизирующий цитотоксин, цитотоксин-ассоциированный антиген, перекрестно реагирующие антигены) Сарсенбаева (2005), Исаков (2002).

Большинство бактерий *H. pylori* при колонизации организма находятся в свободном состоянии, но около 20% присоединяется к эпителиальным клеткам желудка. Именно благодаря адгезии *H. pylori* создаются предпосылки к реализации его патогенного потенциала, и уменьшается вероятность элиминации защитными силами организма. Адгезия происходит за счет взаимодействия лигандов микроорганизма с соответствующими рецепторами желудочного эпителия Доморадовский (2001). У *H. pylori* выявлено несколько адгезинов, определяющих выбор хозяина, из них наиболее изучены белки *bab (blood-group associated binding adhesion*), гены которых — *babA1*, *babA2* и *babB* — присутствует в виде нескольких аллелей Yamaoka (2008). Ген *babA2* идентичен *babA1* гену за исключением вставки 10 пар оснований с повторным

мотивом в сигнальной последовательности пептида, которая заканчивается созданием поступательного инициирующего кодона и имеет способность к связыванию с Льюис-подобными антигенами (Leb). Наличие генов *babA1* и *babA2* в геноме *H. pylori* связано с более высокой частотой развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, осложненного течения инфекции *H. pylori*, а присутствие гена *babA2* — также с аденокарциномой желудка Барышникова (2009).

Существует несколько различных механизмов регулирования экспрессии гена *babA* на уровне транскрипции и трансляции. Регуляция экспрессии данного гена на уровне трансляции связана с образованием химерных белков, которые играют важную роль. Химера образуется между *babA* и *babB* Pride (2002). Кроме этого существует регуляция на уровне геномных мутаций в кодирующей области гена *babA* Pride (2001), Colbeck (2006), Hennig (2006), Sheu (2003).

Существует также регуляция и на уровне транскрипции. Backstrom и др. показали, что только ген *babA2* транскрибируется в штамме CCUG17875 Backstrom (2004), а не ген *babA2*. Анализ этих генов показал, что транскрипция *babA* регулируется количеством аденина [поли (A)] в промоторной области от -10 до -35 гена *babA*. Экспрессия была стабильна, когда число остатков аденина равнялось 10 (*babA2*), но при 14 остатках аденина в гене BabA1 транскрипция блокировалась.

К числу факторов вирулентности *H. pylori* помимо колонизации и адгезии относится способность к пенетрации (клеточной инвазии). Пенетрация - свойство бактерий проникать в эпителиальные клетки посредством системы секреции типа IV, предназначенной для непосредственного впрыскивания в эукариотические клетки различных эффекторных белков (в случае *H. pylori* продуктов гена *cagA*), вызывающих каскад процессов, приводящих к необратимому повреждению и изменению морфологии клеток Parsonnet (1997).

Геном микроорганизма отличается вариабельностью и нестабильностью и способен с высокой скоростью мутировать Барышникова (2009).

В геноме *H. pylori* имеются гены, ассоциированные с повышенной патогенностью микроорганизма – *vacA, cagA, iceA*. С их присутствием связано развитие наиболее значимых заболеваний желудка: атрофического гастрита, желудочных и дуоденальных язв, рака желудка Yamaoka (2005). В настоящее время наиболее изучен цитотоксин-ассоциированный ген А (*cagA)*, кодирующий образование вакуолизирующего цитотоксина А, который, действуя на АТФазу V-типа, создает кислую среду внутри вакуолей эпителиальных клеток желудка и тем самым обеспечивает поступление из внутриклеточного пространства внутрь вакуолей аммиака и других веществ. Указанные вещества притягивают воду, и вакуоли набухают. Сливаясь друг с другом, вакуоли приводят к разрыву клеточной мембраны и гибели клетки Atherton (1998).

Вакуолизирующий цитотоксин-ассоциированный ген (Vacuolating cytotoxin-associated gene – *vacA*) присутствует в геноме всех известных штаммов *H. pylori*. В то же время существуют различные подтипы (s1a, s1b, s1c, s2) и аллельные комбинации (m1 и m2) этого гена. Штаммы s1/m1 характеризуются самым высоким уровнем цитотоксической активности и наибольшей плотностью колонизации слизистой оболочки желудка. В то же время s2/m2 штаммы проявляют незначительную токсическую активность. При любом варианте гена *vacA* активность продуцируемого им цитотоксина возрастает по мере снижения pH желудочного сока Шкитин (2002). Особую значимость представляют данные о том, что большинство штаммов *H. pylori* с генотипом *vacA s1* также имеют островок патогенности *cag*, что позволяет оценивать его как суррогатный маркер островка патогенности Исаков (2002).

Кроме вакуолизации клеток желудочного эпителия, *vacA* оказывает и другие эффекты: ингибирует секрецию соляной кислоты в желудке, увеличивает секрецию пепсиногена, снижает каталитическую активность эндосом и лизосом, ингибирует клеточную пролиферацию, повреждает митохондрии, дезорганизует цитоскелетную архитектонику клеток желудочного эпителия Воропаева (2008). *VacA* наряду с уреазой играет большую роль и в повреждении межклеточных контактов, а также помогает бактерии получать питательные вещества, способствуя прохождению мелких молекул сквозь клеточные мембраны Ющук (2006).

Установлено, что геномы некоторых штаммов *H. pylori* содержат общую специфическую последовательность, включающую более 40 генов, называемую «островком патогенности» (PAI), представляющим собой генетически вариабельный участок, ответственный за образование основных факторов вирулентности и адгезию микроорганизма к слизистой оболочке желудка Доморадовский (2001). Маркером PAI является цитотоксин-ассоциированный ген *cagA* (cytotoxin-associated gene A), который кодирует образование криптического иммунодоминантного протеина CagA. Данный белок признан одним из основных факторов вирулентности *H. pylori* и считается ответственным за нарушение целостности эпителия слизистой желудка, индукцию неконтролируемой пролиферации эпителиальных и лимфоидных клеток, секрецию провоспалительных цитокинов и возникновение воспалительной реакции слизистой оболочки Окороков (2000). Ген *cagA* является абсолютно специфическим для *H. pylori* и, видимо, жестко связан с обитанием *H. pylori* в желудке человека Ivie (2008).

В генетических исследованиях было показано, что инфицирование *cagA*-позитивными штаммами *H. pylori* является фактором риска развития выраженного воспалительного ответа в слизистой оболочке желудка. Как правило, пациенты с cagA+ штаммами в значительно большей степени подвержены риску развития язвенной болезни и рака желудка, чем инфицированные *cagA* — штаммами El-Omar (2003).

Помимо прочего, была показана связь между инфекцией *cagA*-положительными штаммами и язвенной болезнью у человека. Однако последующие исследования заставили усомниться в полученных результатах. Miehlke и соавт. (2009) показали, что до 80% пациентов без язвенной болезни желудка в штате Техас были инфицированы штаммами *H. pylori*, которые обладали геном *cagA*. В Китае и Японии, CagA-положительные штаммы широко представлены в человеческой популяции, но не связаны с язвенной болезнью Atherton (1998). У детей также заражение CagA-положительными штаммами часто не связано с увеличением частоты язвенной болезни Williams (1997).

Для систематизации знаний о генетических и фенотипических особенностях *H. pylori* многочисленные штаммы объединяют в группы: тип 1 - cagA+ и vacA+ и тип 2 - cagA— и vacA— . В многочисленных исследованиях показано, что в группе больных с язвенной болезнью достоверно чаще встречаются штаммы *H. pylori* с комбинацией генотипов 1-го типа (cagA+ и vacA+), определяю-

щей высокую вирулентность хеликобактера Peek (1998). Однако описаны случаи, когда от одного и того же человека выделяются штаммы обоих типов, что может быть результатом суперинфекции или нестабильности генома *H. pylori*, сопровождающейся постоянной рекомбинацией между штаммами. Такая особенность микроорганизма помогает ему лучше приспосабливаться к хозяину и способствует возникновению различных мутантов, в частности, обладающих устойчивостью к некоторым химиотерапевтическим средствам.

Еще один фактор патогенности *H. pylori* – ген цитотоксичности *iceA* (induced by contact with epithelium), который активируется при контакте с эпителиоцитами слизистой оболочки и существует в двух аллельных формах — *iceA1* и *iceA2*. У больных, инфицированных *H. pylori* с генотипом *iceA1*, инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки желудка полиморфно-ядерными нейтрофилами выше, чем в случае *iceA2*. Имеются данные, указывающие на то, что аллель *iceA1* чаще встречается при язвенной болезни, а *iceA2* ассоциирован с гастритами Dhaenens (1997).

Таким образом, имеющиеся в литературе данные о роли комбинаций основных антигенов *H. pylori* в развитии заболеваний гастродуоденальной области достаточно противоречивы. В одних исследованиях отмечена очевидность последовательности cagA+, vacAs1+, vacAm2+, как основного маркера высокой вирулентности и связи с развитием язвенной болезни Мишкина (2007), другими авторами те же генетические маркеры подвергаются сомнению. Несомненно, все возможные факторы вирулентности *H. pylori* косвенно или непосредственно влияют на протекание патологического процесса, однако достоверно не установлено, каким же образом *H. pylori* вызывает ту или иную форму патологии желудка и двенадцатиперстной кишки, и от чего зависит исход заболевания.

Цель исследования

Выявление возможной зависимости характера гастродуоденальной патологии от генетических особенностей инфицирующего штамма *H.pylori*.

Материал и методы

Исследование проведено у пациентов Национального научного медицинского центра Астаны с *H.pylori*-ассоциированными язвенной болезнью и гастритом. С помощью гистологического метода и полимеразной цепной реакции (ПЦР) были исследованы образцы СОЖ 19 пациентов в возрасте от 27 до 48 лет. Пациенты подвергались эндоскопии с прицельной биопсией СОЖ из антрального отдела. В гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином по методу Гимзы, оценивали обсемененность *H.pylori*, степень адгезии микроорганизмов к эпителиальным клеткам СОЖ. Для культивирования бактерий образцы биопсии размачивали и высевали на колумбийский агар содержащий 5% донорскую лошадиную сыворотку и селективный антибиотик колистин. Чашки с агаром инкубировались в 10% CO_2 до пяти дней. Колонии идентифицировались как *Helicobacter pylori* согласно стандартным критериям, включающим окрашивание по Грамму, морфологию клеток и идентификацию *Helicobacter pylori* с помощью 16S генотипирования. С помощью ПЦР определяли наличие генов CagA (500 bp ампликон), VacA s1 (300 bp ампликон), VacA s2 (600 bp ампликон), BabA (800 bp ампликон) [3]. Визуализацию продуктов ПЦР осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле с фотографированием в ультрафиолетовом свете и получением фотографического изображения продуктов ПЦР.

Результаты

У исследуемых пациентов тип *H.pylori* (cagA(+)) обнаружен у 11 человек (57,89%), тип *H.pylori* (vacA(+)) выявлен у 19 пациентов (100%). При язвенной болезни желудка отмечалась инфицированность исключительно *H.pylori* (cagA(+)) типа. У всех пациентов (язвенная болезнь желудка, гастрит) был диагностирован «эндоскопический» и «гистологический» гастрит (100%). Полученные результаты показывают, что достоверных различий в активности воспаления и обсемененности при разных типах *H.pylori*-инфекции замечено не было, в отличие от показателей адгезии в теле желудка, которые при *H.pylori*-инфекции (cagA(+)) типа были достоверно выше, чем при инфицировании *H.pylori* (vacA(+)) типа. Частота встречаемости генов факторов вирулентности VacA, CagA, BabA, IceA2 в исследуемой выборке представлена в таблице 1.

Таблица. Частота VacA, CagA, BabA, IceA2 генов в изолятах H. pylori

Генотип				Количество (%)
VacA	CagA	BabA	IceA2	
+	+	+	+	6 (31,6)
+	+	-	+	2 (10,5)
+	+	-	-	3 (15,8)
+	-	-	-	8 (42,0)
19 (100)				

Степень бактериальной адгезии к клеткам желудочного эпителия оказалась минимальной у пациентов с язвенной болезнью желудка, инфицированных штаммами *H.pylori* (vacA(+)). Наибольшие значения показателей активности гастрита отмечены у пациентов с гастритом, инфицированных штаммами *H.pylori* (vacA(+)), и у пациентов с язвенной болезнью желудка, инфицированных штаммами *H.pylori* (cagA(+)). Наивысшая степень бактериальной обсемененности отмечена у пациентов с гастритом, инфицированных штаммами *H.pylori* (vacA(+)). Самые высокие показатели адгезии микроорганизмов к желудочным эпителиоцитам обнаружены в антральном отделе желудка у пациентов с язвенной болезнью желудка инфицированных штаммами *H.pylori* (vacA(+)). При этом численные значения показателей активности гастрита, бактериальной обсемененности и адгезии, незначительно варьируя между исследуемыми и в зависимости от генетических характеристик инфицирующих штаммов *H.pylori*, были весьма сходными.

Выводы

В развитии конкретной нозологической формы *H.pylori*-ассоциированного повреждения слизистой оболочки гастродуоденальной зоны участвуют не только бактериальные факторы, но также велика роль факторов организма инфицированного хозяина. Этим объясняется развитие широкого спектра *H.pylori*-ассоциированных заболеваний, начиная от бессимптомного носительства и заканчивая развитием злокачественных опухолей желудка, пищевода и 12-перстной кишки.

Высокая генетическая гетерогенность штаммов *H.pylori* может быть обусловлена высокой частотой ге-

нетических рекомбинаций между микроорганизмами в процессе длительной колонизации одного и того же хозяина, что создает противоречия в оценке роли некоторых факторов вирулентности в развитии той или иной ассоциированной патологии.

Литература

1. Барышникова Н.В. Актуальные проблемы диагностики хеликобактериоза // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2009, 2, 50.
2. Воропаева А.Л., Воропаев Е.В., Баранов О.Ю. и др. Алгоритм определения аллельных вариантов и генотипов Helicobacter pylori с использованием полимеразной цепной реакции // Инструкция по применению, 2008, 36.
3. Доморадовский И.В. Вопросы патогенности Helicobacter pylori // Рос. журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол., 2001, 11, 2, 13, 113.
4. Исаков В.А. Молекулярно-генетические основы патогенности Helicobacter pylori // Рос. журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол., 2002, 12, 6, 82-85.
5. Кудрявцева Л.В., Щербаков П.Л., Иваников И.О. и др. Helicobacter pylori — инфекция: современные аспекты диагностики и терапии // Пособие для врачей. 2004, 41.
6. Мишкина Т.В., Александрова В.А., Суворов А.Н. Влияние различных генотипов Helicobacter pylori на клинико-эндоскопические и морфологические проявления хронических гастродуоденальных заболеваний у детей и подростков // Педиатрия, 2007, 5, 86, 28.
7. Окороков А.Н. Диагностика болезней внутренних органов: Т.1. Диагностика болезней органов пищеварения, 2000, 560.
8. Сарсенбаева А.С. Роль вирулентных штаммов Helicobacter pylori в формировании осложнений язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Известия Челябинского научного центра, 2005, 2, 121-124.
9. Хомерики С.Г., Морозов И.А. Роль кокковых форм Helicobacter pylori в патогенетических механизмах и персистенции хеликобактерной инфекции // Рос. журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол., 2001, XI, 2, 13, 99.
10. Шкитин В.А., Шпирна Г.Н., Старовойтов Г.Н. Роль Helicobacter pylori в патологии человека // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2002, 4, 2, 128-145.
11. Ющук Н.И. Инфекция Helicobacter pylori / Н.И. Ющук, В.Т. Ивашкин, И.В. Маев // Мед. газета, 2006, 40, 8-9.
12. Atherton J.C. Helicobacter pylori virulence factors // Br Med Bull, 1998, 54, 105-20.
13. Backstrom A., Lundberg C., Kersulyte D., Berg D.E., Boren T., Arnqvist A. Metastability of Helicobacter pylori bab adhesion genes and dynamics in Lewis b antigen binding. // Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101, 16923-16928.
14. Colbeck J.C., Hansen L.M., Fong J.M., Solnick J.V. Genotypic profile of the outer membrane proteins BabA and BabB in clinical isolates of Helicobacter pylori. // Infect Immun 2006, 74, 4375-4378.
15. Dhaenens L., Szczebara F., Husson M.O. Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from Helicobacter pylori // Infect Immun., 1997, 65, 2, 514-8.
16. El-Omar E.M. et al Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. // Gastroenterology, 2003, 124, 5, 1193-1201.
17. Hennig E.E., Allen J.M., Cover T.L. Multiple chromosomal loci for the babA gene in Helicobacter pylori. // Infect Immun 2006, 74, 3046-3051.
18. Ivie S.E., McClain M.S., Torres V.J. et al. Helicobacter pylori VacA Subdomain Required for Intracellular Toxin activity and Assembley of Functional Oligomeric Complexes.// Infection and Immunity, 2008, 76, 7, 2843-2851.
19. Lu H., Yamaoka Y., Graham D.Y. Helicobacter pylori virulence factors: facts and fantasies // Curr. Opin. Gastroenterol., 2005, 21, 653-659.
20. Parsonnet J., Friedman G.D., Orentreich N. et al. Risk for gastric cancer in people with cagA positive or cagA negative Helicobacter pylori infection // Gut 1997, 40, 297-301.
21. Peek R.M. Adherence to gastric epithelial ceels induces expression of a Helicobacter pylori gene, iceA, that is associated with clinical outcome // Proc. Assoc. Am. Physicians., 1998, 110, 6, 531-544.
22. Pride D.T, Blaser M.J. Concerted evolution between duplicated genetic elements in Helicobacter pylori. // J Mol Biol 2002, 316, 629-642.
23. Pride D.T., Meinersmann R.J., Blaser M.J. Allelic Variation within Helicobacter pylori babA and babB. // Infect Immun 2001, 69, 1160-1171.
24. Sheu B.S., Sheu S.M., Yang H.B., Huang A.H., Wu J.J. Host gastric Lewis expression determines the bacterial density of Helicobacter pylori in babA2 genopositive infection. // Gut 2003, 52, 927-932.
25. Williams C.L. Helicobacter pylori: bacteriology and laboratory diagnosis // J Infect 1997, 34, 1-5.
26. Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal Pathogenesis // World J Gastroenterol 2008, 14, 27, 4265-4272.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КАНДИДОЗА В АМБУЛАТОРНО-ПОЛИКЛИНИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

А.А. Жумабаева
ГБ №1 г. Астаны

И.Е. Касымханова
поликлиника №4 г. Караганды

Аннотация

Особенности лабораторной диагностики кандидоза в амбулаторно-поликлинических условиях. Преимущества цитологического исследования при кандидозах.

Амбулаториялық-емханалық жағдайында кандидозының ертханалық диагностикасының ерекшеліктері. Кандидоздың цитологиялық зерттеу артықшылықтары.

Candidiasis' laboratory diagnostics peculiarities in outpatients' clinic conditions. Candidiasis' cytologic research advantages.

Ключевые слова: кандидоз, цитологические методы исследования

Актуальность своевременной диагностики кандидоза и его раннего лечения чрезвычайно высока. По данным Всемирной организации здравоохранения от грибковых заболеваний страдает каждый пятый житель планеты. За счет экологических сдвигов и нарушений статуса кандидоз получает все большее распространение.{1}

Проявлениями грибковых заболеваний являются различные локальные поражения кожи, ногтей, слизистых оболочек полости рта, кишечника, уретры и влагалища. Однако при серьезных нарушениях иммунореактивности организма может наступить генерализация процесса и тогда грибковые заболевания приобретают жизнеугрожающий характер [1].

В связи с тем, что для заболевания кандидозом характерен полиморфизм клинических проявлений лабораторному исследованию подлежит разнообразный патологический материал. В зависимости от характера и локализации поражения, для анализа берут:

- мокроту;
- соскобы кожи и слизистых оболочек;
- ногтевые чешуйки;
- пунктаты из закрытых полостей и отделяемое свищей;
- биопсированный и секционный материал.

Для исследования берется нативный материал в чистую пробирку или предметное стекло, высушивается, после чего проводится микроскопия препарата [2].

Обнаружение нитчатой фазы возбудителя (мицелия) является важным свидетельством наличия кандидоза. Данный метод позволяет без особого труда диагностировать такое патологическое состояние, как кандидоз гениталий, вызываемый дрожжеподобными грибками рода Candida (на его долю приходится 20-25 % всех инфекционных вагинитов, чувствительность метода 40-60%). Для диагностики кандидоза проводится микроскопическое исследование материала, взятого из очага поражения [3].

Наибольшую диагностическую ценность представляет изучение мокроты на наличие в ней различных видов грибков, различающихся по следующим морфологическим признакам:

1. Род Candida – почкующиеся клетки и короткие почкующиеся нити псевдомицелия. Обнаружение их в мокроте говорит об активации процесса.
2. Род «Criptococcus – возбудитель бластомикоза. Имеет вид округлых, частью почкующихся клеток с толстыми двухконтурными стенками.
3. Род Aspergillus имеет вид обрывков широких нитей мицелия и круглых темно-зеленных спор.
4. Род Actinomyces встречается при поражении легких актиномикозом. Для его обнаружения из мокроты выделяют мелкие желтоватые и серовато- белые с зеленым оттенком зернышки, представляющие друзы лучистого гриба, исследуют под микроскопом. Центральная часть друзы состоит из густого компактного сплетения тонких ветвящихся ветвей мицелия с пигментированными зернами, по периферии клубок мицелия окружен зоной из булавовидных образований со вздутиями на концах, сильно преломляющих свет. Эти образования расположены частоколом и сообщают друзе лучистое строение [4].

- В моче в норме дрожжевые грибы отсутствуют, но они могут быть обнаружены при глюкозоурии, антибактериальной терапии.
- В дерматовенерологии для подтверждения диагноза дерматомикозов исследуют соскобы с пораженного органа или его части. При подозрении на грибковое заболевание стоп для лабораторных исследований берут частицы эпидермиса стоп, при поражении ногтевых пластинок – берут скальпелем крошащиеся желтоватые массы и исследуют в неокрашенных препаратах. Применяют несколько методов исследования на грибы: обработка патологического материала перед микроскопией с диметилсульфоксидом - ДМСО (КОН - 15 г, ДМСО - 15 г, дистиллированной воды - 7 мл), позволяющий исследовать материал без предварительного подогревания через 10 мин; патологический материал помещают на предметное стекло и на него наносят 2-3 капли едкой щелочи (20-30% раствор КОН). При исследовании препарат волос осторожно подогревают над пламенем горелки до появления паров щелочи. Затем препарат накрывают покровным стеклом и просматривают сначала при малом (×10), а затем при большом (×100) увеличении микроскопа; более простой и удобный метод исследования чешуек и ногтей заключается в том, что патологический материал помещают в пробирку и заливают 10-20% раствором едкой щелочи (КОН). Пробирки оставляют при комнатной температуре до следующего дня. Через 20-24 часа наступает полное размягчение и просветление чешуек ногтевых пластинок. Избыточное количество щелочи сливают, а осадок помещают на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом. Этот метод имеет известное преимущество при массовых

лабораторных исследованиях. Он позволяет просматривать сразу большое количество патологического материала без повторного многократного приготовления препаратов, в результате чего повышается тщательность и достоверность исследования [3].

Таким образом, из вышесказанного следует, что цитологический метод обнаружения кандидоза наиболее распространен, ввиду его наибольшей информативности, доступности исполнения (исключается специальная подготовка персонала лаборатории и пациента), а также экономичности, т.к. не требует наличия дорогостоящего оборудования и реагентов для проведения анализа.

Литература

1. А.А. Кишкун. «Руководство по лабораторным методам диагностики», Москва, 2009, стр. 98-112.
2. А.А. Кишкун «Современные технологии повышения качества клиническойлабораторной диагностики», Москва ,2007 стр. 39-45.
3. Ю.Ю. Елесеева, «Анализы. Полный справочник», Москва, 2006, стр. 112-115.
4. Стандарт ИСО 15189-2008 «Лаборатории медицинские. Специфические требованию к качеству и компетенции».

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

У.А. Кожамкулов
к.м.н, ведущий научный сотрудник, РГП «Национальный центр биотехнологии РК» КН МОН РК, г. Астана

А.Б. Шевцов
к.б.н, снс, РГП «Национальный центр биотехнологии РК» КН МОН РК, г. Астана

А.Ж. Ахметова
бакалавр, мнс, РГП «Национальный центр биотехнологии РК» КН МОН РК, ЕНУ им. Л.Н.Гумилева, г Астана

П.В. Тарлыков
магистр, нс, РГП «Национальный центр биотехнологии РК» КН МОН РК, ЕНУ им. Л.Н.Гумилева, г. Астана

Д.А. Мухамедьяров
бакалавр, мнс, РГП «Национальный центр биотехнологии РК» КН МОН РК, ЕНУ им. Л.Н.Гумилева г. Астана

Е.М. Раманкулов
PhD, генеральный директор, РГП «Национальный центр биотехнологии РК» КН МОН РК, г. Астана

Аннотация

Молекулярно-генетическое определение лекарственной устойчивости к антибиотикам и противовирусным препаратам используется в клинической практике во многих странах мира. Кроме того, существуют многочисленные данные о взаимосвязи генотипов с клиническим течением болезни и терапевтическим эффектом. Использование молекулярно-генетических подходов в настоящем исследовании хорошо иллюстрируется двумя примерами: оценка спектра и распространенности мутаций в генах, обуславливающих резистентность к протвотуберкулезным препаратам рифампицину и изониазиду среди штаммов, изолированных на территории Казахстана, а также изучение генетического распределения и оценки лекарственной устойчивости вируса гепатита В у пациентов, обследованных в г. Астана.

Антибиотиктер және вирусқа қарсы препараттарға дәрілік төзімділіктің молекулалық-генетикалық анықтамасы дүниежүзінің көптеген мемлекеттерінде клиникалық тәжірибеде қолданылады. Одан басқа, генотиптердің аурудың клиникалық ағымы және терапиялық әсерімен өзара байланысы туралы көптеген деректер бар. Осы зерттеуде молекулалық-генетикалық әдістердің қолданылуы екі мысалмен жақсы көрсетілген: Қазақстан территориясында таралған штаммдар арасында туберкулезға қарсы препараттарға рифампицин және изониазидке төзімділікті анықтайтын гендердегі мутациялардың спектрін және таралуын бағалау, сонымен қатар Астана қаласында тексерілген науқастарда В гепатиті вирусының генетикалық таралуын зерттеу және дәрілік төзімділігін бағалау.

Molecular genetic identification of drug resistance to antibiotics and antiviral drugs used in clinical practice in many countries of the world. In addition, there are numerous data on the relationship between genotypes with the clinical course of disease and therapeutic effect. The use of molecular genetic approaches in this study is well illustrated by two examples: assessment of the scope and prevalence of mutations in genes that lead to resistance to rifampicin and isoniazid protvotuberkuleznym resistance among strains of isolated on the territory of Kazakhstan, as well as the study of the genetic distribution and evaluation of drug resistance in hepatitis b patients surveyed in Astana.

Ключевые слова: инфекционные заболевания, туберкулез, *M.tuberculosis,* лекарственная устойчивость, генотипирование, вирусный гепатит В

Введение

В настоящее время молекулярно-генетические методы нашли широкое применение в медицине для изучения инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы. Во всем мире наиболее актуальной проблемой, препятствующей борьбе с туберкулезом, является развитие у *M. tuberculosis* устойчивости к лекарственным препаратам, что ведёт к снижению эффективности и увеличению сроков химиотерапии, а так же к росту лекарственно-устойчивого туберкулеза в различных регионах мира, согласно данным WHO report (2009), WHO (2008), Okeke и соавт. (2005), Maher и соавт. (2005), Raviglione и соавт. (2003), Aziz и соавт. (2006). По данным ВОЗ в 2007г. насчитывалось приблизительно 0,5 миллиона случаев ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (ТБ-МЛУ). 85% таких случаев приходится на 27 стран (из которых 15 - в Европейском регионе, включая Казахстан).

После распада СССР в 1991 г. произошли политические и социально-экономические перемены, повлиявшие на систему здравоохранения и общий уровень жизни населения, ухудшились социально-бытовые условия жизни населения, увеличилась безработица. По данным Toungoussova и соавт. (2006) в это же время, в странах Восточной Европы и бывшего СССР, началось увеличение эпидемиологических показателей по туберкулезу и в том числе показателей по лекарственно-устойчивому туберкулезу. В последние годы в странах бывшего СССР отмечено распространение штаммов *M. tuberculosis* семейства Beijing, ассоциированных с высоким риском распространения лекарственной устойчивости Nikolayevskyy и соавт. (2007), Kovalev и соавт. (2005), Mokrousov и соавт. (2008). В Казахстане, по данным Национального центра проблем туберкулеза Абильдаев Т.Ш. (2011), заболеваемость туберкулёзом в 2010г. составляла 95,3 на 100 тысяч населения, а смертность составляла 10,6 на 100 тысяч населения.

Основное значение при лечении туберкулеза, несомненно, имеет устойчивость к основным и наиболее эффективным в настоящее время препаратам – изониазиду и рифампицину. Одновременная устойчивость к этим двум препаратам, трактуется как множественная лекарственная резистентность (Multidrug resistance - MDR). Такой вид специфического поражения легочной ткани получил определение как мультирезистентный туберкулез Schwúbel и соавт. (2000). Заболеваемость туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью в период с 2003 по 2010 гг. увеличилась в 2 раза и составляла в 2010г. - 10,5 на 100 тысяч населения. Таким образом, в Казахстане сохраняются высокие показатели заболеваемости и смертности, увеличивается заболеваемость мультирезистентными формами туберкулеза, что является весьма серьезной проблемой, которая усложняет борьбу с этим заболеванием.

В современной эпидемиологии туберкулеза важным компонентом является изучение вопроса и закономерностей развития эпидемии туберкулеза, изучение причин и факторов, способствующих распространению штаммов *M.tuberculosis*, обладающих определенными свойствами. Для этого проводится идентификация и специфическая характеристика штаммов по определенным признакам, что позволит решать такие вопросы, как его происхождение, выявление источника инфекции, вероятные пути и факторы передачи, а так же выявлять случаи возникновения и распространения устойчивости к химиотерапевтическим препаратам Афанасьев (2008). В этом направлении молекулярно-генетические подходы типирования *M.tuberculosis* получило развитие и внедрение в лабораторную практику. Они базируются на обнаружении отличий в структуре и частоте встречаемости определенных генетических элементов среди различных штаммов *M.tuberculosis*.

Инфекционный вирусный гепатит В остается глобальной проблемой здравоохранения с высоким уровнем инфицирования и смертности. По данным **Mahtab** и соавт. (2008), приблизительно 5% мирового населения заражены вирусом гепатита В, около 400 миллионов являются хроническим носителями гепатита В, из которых 75% - 80% проживают в Азии и западной Океании. Современная классификации подразделяет вирус гепатита В на 8 различных генотипов, обозначающие буквами алфавита от А до Н. Деление основано на генетическом отличие полных геномов вируса не менее чем на 8%. Генотипы от А до D а также генотип F, делятся на субгенотипы генетическая вариабельность между которыми составляет от 4 до 8% Schaefer (2007). Генотипам вируса гепатита В свойственно устойчивое географическое распределение. В Юго-Восточной Азии и Океании превалируют генотипы В и С, тогда как в западноевропейских странах наиболее распространены А и D генотипы. Генотип D является преобладающим в Средиземноморском бассейне, на Ближнем Востоке и Средней Азии. В северной Америке преобладает генотип С затем по убыванию А и В. Генотип Е встречается в Африке, F – у коренных жителей Америки и Полинезии, генотип G – распространен в США и Франции, а генотип Н преимущественно регистрируется в центральной Америке **Mahtab** и соавт. (2008).

Важность генотипирования связано не только с эпидемиологическим значением, но также отмечена корреляция между клиническим течением гепатита В и его генотипами. Так по данным McMahon (2009), высокий риск развития гепатоцеллюлярной ***карциномы (HCC) связан с*** генотипами С, В2-5, и F1, в то время как низкий риск развития HCC связан с генотипами В1, В6, и А2. Существует взаимосвязь генотипов с элиминацией HBeAg, а также противовирусным лечением Maeshiro и соавт. (2007).

Результаты и обсуждение

Генотипирование мультирезистентных изолятов *M. tuberculosis*

Лекарственная чувствительность *M. tuberculosis* к изониазиду и рифампицину определялась методом абсолютных концентраций, согласно рекомендациям ВОЗ. Амплификацию фрагментов *rpoB* и *katG*, промоторной области оперона *fabG-inhA, oxyR-ahpC M.tuberculosis* проводили в амплификаторе. ДНК секвенирование с последующим определением нуклеотидных последовательностей *rpoB*, *katG*, промоторной области оперона *fabG-inhA, oxyR-ahpC* генов осуществляли с помощью генетического анализатора ABI 3730 (Applied Biosystems). Проведено генотипирование мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis* методом сполиготипирования.

В нашем исследовании были определены мутации, обуславливающие устойчивость к рифампицину и изониазиду у мультирезистентных изолятов (рифампицин и изониазид устойчивых), циркулирующих в различных регионах Казахстана. Для генетических исследований изучалась выборка из 479 клинических изолятов *M. tuberculosis*, включающая 415 мультирезистентных изолятов (изоляты устойчивые к рифампицину и изониазиду), 51 изониазид-устойчивых изолятов и 13 рифампицин-устойчивых изолятов. Нуклеотидные замены, приводящие к устойчивости к рифампицину, в основном встречаются между 507 и 533 кодонами *rpoB* гена, так называемом регионе, определяющем устойчивость к рифампицину (rifampin resistance determinant region (RRDR)). Среди 428 рифампицин-устойчивых клинических изолятов мутации были обнаружены у 97,0% изолятов. Было выявлено 16 различных вариантов мутаций в 7 кодонах Ser531, His526, Asp516, Leu533, Gln510, Leu 511, Ser 512. Большинство нуклеотидных замен приходится на 531 кодон *rpoB* гена и составляет 83,9%, где выявлено 4 различных вариантов однонуклеотидных замен с преобладанием замены серина на лейцин (80,6%). Следует отметить, что Казахстан находится между двумя крупными государствами – Россией и Китаем, где хорошо изучены спектры мутаций в *rpoB* гене клинических изолятов *M.tuberculosis*. Частота мутаций в *rpoB* гене казахстанских штаммов отличается от частоты мутаций в *rpoB* гене штаммов *M.tuberculosis* из

России и Китая, при этом отмечается увеличение доли мутаций в 531 кодоне рифампицин-устойчивых штаммов *M.tuberculosis,* циркулирующих на территории Казахстана, в отличии от циркулирующих штаммов в соседних странах.

Мутации, определяющие резистентность к изониазиду, исследовались в гене *katG,* промоторной области оперона *fabG-inhA, oxyR-ahpC* 466 изониазид-устойчивых изолятов *M.tuberculosis*. Среди изониазид-устойчивых клинических изолятов мутации в генах, определяющие устойчивость к изониазиду, были обнаружены в 99,8%. В гене *katG* у 98,5% выявлена мутация в 315 кодоне, приводящая к замене аминокислоты серина на треонин, включая в 7,1% двойные мутации т.е. замены одновременно в *katG* гене и -8 и -15 позиции промоторной области *mabA(fabG)–inhA* оперона.

Проведено генотипирование 148 мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis,* где определены семейства, циркулирующих в Казахстане штаммов, среди них преобладающим генотипом является генотип семейства Beijing (87,2%), остальные составляют соответственно LAM – 6,0%, T1 – 4,1%, T4 – 2,7%. В таблице 1 показаны выявленные генотипы среди 148 образцов из девяти областей Республики Казахстан.

Таблица 1. Результаты сполиготипирования клинических штаммов M. tuberculosis, циркулирующих в Казахстане

№	Семейство	Число штаммов (%)
1	Beijing	129 (87,2)
2	LAM	9 (6,0)
3	T1	6 (4,1)
4	T4	4 (2,7)

Сполиготип для каждого штамма записывался в двоичном формате, где для каждого из 43 спейсерных промежутков DR-региона единицей (1) обозначалось наличие сигнала, а нулем (0) – его отсутствие. Для определения семейства, к которому относился штамм, использовалась ранее опубликованная база SpolDB4. Международный сполиготип (Spoligotype International Type; SIT) каждого штамма определялся путем сравнения полученных результатов с базой данных SPOTCLUST (http://cgi2.cs.rpi.edu/~bennek/SPOTCLUST.html).

На основании результатов сполиготипирования выделено четыре кластера, содержащих от 2 до 67 штаммов, имеющих идентичный сполигопаттерн. Наибольший кластер – 129 (87,2 %) штаммов – был образован штаммами, относящимися к семейству W-Beijing.

Генотип Beijing является отличительным для нашего региона семейством туберкулеза. В 1995 году изоляты *M. tuberculosis* с похожей характеристикой были найдены в Пекине (на английском “Beijing”), и были названы семейством “Beijing”. Штаммы этого семейства наиболее вирулентные, этот генотип также имеет ассоциацию с лекарственной устойчивостью.Этот генотип преобладает среди молодых индивидуумов и является показателем роста передачи туберкулеза в данное время. Данный генотип повсеместно распространяется во многих регионах мира, в том числе в регионах, где ранее он не обнаруживался.

Генотипирование и определение лекарственной устойчивости вируса гепатита В

В исследование по генотипированию вируса гепатита В было включено 115 образцов ДНК, выделенных из плазмы крови пациентов с хроническим гепатитом В. Для амплификации фрагмента полимеразного гена были использован вложенный (nested) ПЦР с праймерами, описанными Vincenti и соавт. (2009). Определение нуклеотидной последовательности осуществляли с использованием автоматического генетического анализатора 3730xl DNA Analyzer, комплекта реагентов BigDye terminator cycle sequencing kit v 3.1 и внутренних праймеров.

Обработка нуклеотидных последовательностей и анализ аминокислотных замен, обуславливающие лекарственную устойчивость, осуществлен с использованием программного обеспечения SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems). Определение генотипов было осуществлено построением филогенетических деревьев с использованием Mega 5.05 и метода присоединения ближайших соседей (Neiighbor-Joining, NJ). В анализ были включены референтные последовательности различных генотипов вируса гепатита В, взятые из базы данных Gene Bank http://www.ncbi.nih.gov (рис. 1).

Рис. 1. Филогенетическое дерево изолятов идентифицированных как генотип D. Mega 5.05, метод Neighbor-joining.
▲ – обозначаются референтные последовательности из Gene Bank с указанием генотипа и инвентарного номера

Филогенетический анализ 115 обработанных нуклеотидных последовательностей вируса гепатита В с референтными последовательностями позволил идентифицировать у 93% пациентов генотип D (n-107), генотип А установлен в 4,35% (n-5) случаев, а генотип С в 2,6 % (n-3).

Как видно на рисунке 1 нуклеотидные послеледовательности гепатита В от 69 (60%) пациентов расположены на одной кладе с референтными последовательности субгенотипа D1. К субгенотипу D2 можно отнести нуклеотидные последовательности от 13 пациентов (11,3%), а 20 (17,4%) последовательностей гепатита В находятся на кладах с референтными последовательностями D3 субгенотипов. Нуклеотидные последовательности от 5 (4,3%) пациентов с генотипом D не удалось субгенотипировать филогенетичским анализом, и они располагаются отдельной кладой.

Анализ аминокислотной последовательности позволил выявить аминокислотную замену T184S, обуславливающая устойчивость к ламивудину в 0,9% (1/115), а к адефовиру (Q215S) в 2,6% (3/115) случаев хронического гепатита В. Низкий процент лекарственной устойчивости вируса гепатита В к нуклеотид(зид)ным препаратам связан с внедрением данных лекарственных препаратов в клиническую практику только в последние несколько лет.

Генотипирование вируса гепатита В широко используется во всем мире, но информация о распределении генотипов в некоторых частях мира отсутствует или представлена ограниченным числом образцов. Несмотря на то, что территория Казахстана высокоэндемична по гепатиту В, мы нашли только один литературный источник Tallo и соавт. (2008) о генотипировании вируса гепатита В, циркулирующего на территории Казахстана, представленный лишь двумя образцами. Наше исследование показывает, что в г. Астана доминирует генотип D, на долю которого приходится около 93% случаев. Распределение генотипов отличается от Восточных и Юго-Восточных Азиатских стран, где доминируют С и В генотипы, за исключением Монголии где, по данным Tsatsralt-Od и соавт. (2006), уровень генотипа D составляет 98,5%. Распределение генотипов в Казахстане наиболее идентично странам Среднего Востока, в которых генотип D встречается примерно от 80% (Египет, Саудовская Аравия, Кувейт) до 100 % (Иран, Турция), причем в последних субгенотип D1 встречается в 94-98%. Необходимо отметить, что в Таджикистане, Узбекистане и России также преобладает генотип D, при этом в России 87% генотипов D относятся к субгенотипу D2.

Таким образом, по результатам наших исследований, было выявлено, что для популяции *M. tuberculosis*, циркулирующей на территории Казахстана, характерна высокая частота встречаемости мутаций в горячих точках гена *rpoB*, обуславливающем устойчивость к рифампицину и мутации в *katG*-гене, определяющем устойчивость к изониазиду. По результатам исследования штаммов *M. tuberculosis* выделенных на территории Казахстана, наблюдается преимущественное распространение MDR-штаммов, отличающихся от штаммов, циркулирующих в соседних странах, с преобладанием генотипа Beijing. Распределение генотипов вирусного гепатита В, отличается от близлежащих азиатских стран например Китая, где доминирующим является генотип С, но идентично распределению генотипов в России. По нашим результатам, в Казахстане доминирует генотип D, на долю которого приходится около 93% случаев.

Литература

1. Абильдаев Т.Ш. Статистический сборник по туберкулезу по Республике Казахстан: Национальный центр проблем туберкулеза МЗ РК, 2011, 68с.
2. Афанасьев М. В. Молекулярное типирование клинических штаммов Mycobacterium tuberculosis. Диссертация, Москва, 2008, 150с.
3. Anti-tuberculosis drug resistance in the world Fourth Global Report: The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002-2007. World Health Organization 2008.
4. M. A. Aziz, A. Wright, A. Laszlo, A. De Muynck, F. Portaels, A. Van Deun, Ch. Wells, P. Nunn, L. Blanc, M. Raviglione Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis Lancet 2006; 368: 2142–54.
5. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009, 303p.
6. Kovalev, E. Y. Kamaev, M. A. Kravchenko, N. E. Kurepina, S. N. Skorniakov Genetic analysis of Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping INT J TUBERC LUNG DIS 2005 9(7):746–752.
7. D. Maher, M. Raviglione Global Epidemiology of Tuberculosis Clin Chest Med26 (2005) 167 – 182.
8. T. Maeshiro, S. Arakaki, T. Watanabe, H. Aoyama, J. Shiroma, T. Yamashiro, T. Hirata, A. Hokama, F. Kinjo, T. Nakayoshi, T. Nakayoshi, M. Mizokami, J. Fujita, H. Sakugawa. Different natural courses of chronic hepatitis B with genotypes B and C after the fourth decade of life. World J Gastroenterol, 2007. 13: p. 4560-4565.
9. M.A. Mahtab, S. Rahman, M. Khan , F. Karim. Hepatitis B virus genotypes: an overview. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2008. 7: p. 457-464
10. B. J. McMahon. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. Hepatol Int., 2009. 3: p. 334–342.
11. Mokrousov, O. Narvskaya, A. Vyazovaya, J. Millet, T. Otten, B. Vishnevsky and N. Rastogi Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype in Russia: in Search of Informative Variable-Number Tandem-Repeat Loci JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2008, p. 3576–3584.
12. V.V. Nikolayevskyy, T. J. Brown, Y. I. Bazhora, A. A. Asmolov, Y. M. Balabanova and F.A. Drobniewski Molecular epidemiology and prevalence of mutations conferring rifampicin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis strains from the southern Ukraine Clin Microbiol Infect 2007; 13: 129–138
13. N. Okeke, K. P. Klugman, Z. A. Bhutta, A. G. Duse, Ph. Jenkins, T. F. O'Brien, A. Pablos-Mendez, R. Laxminarayan Antimicrobial resistance in developing countries. Part II: strategies for containment Lancet Infect Dis 2005; 5: 568–80
14. M. C. Raviglione The TB epidemic from 1992 to 2002 Tuberculosis (2003) 83, 4–14.
15. S. Schaefer. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. World J Gastroenterol, 2007. 13: p. 14-21.
16. S. Schwúbel, C.S.B. Lambregts-van Weezenbeek, M-L. Moro, F. Drobniewski S.E. Hoffner, M.C. Raviglione, H.L. Rieder Standardization of antituberculosis drug resistancesurveillance in Europe Eur Respir J 2000; 16: 364-371.
17. T. Tallo, V. Tefanova, L. Priimagi, J. Schmidt, O. Katargina, M. Michailov, S. Mukomolov,L. Magnius, H. Norder. D2: major subgenotype of hepatitis B virus in Russia and the Baltic region. Journal of General Virology, 2008. 89: p. 1829–1839
18. O. S. Toungoussovaa, G. Bjuneb, D. A. Caugant Epidemic of tuberculosis in the former Soviet Union: Social and biological reasons Tuberculosis (2006) 86, 1–10.
19. B.Tsatsralt-Od, M. Takahashi, K. Endo, O. Buyankhuu, O. Baatarkhuu, T. Nishizawa, H. Okamoto. Infection with hepatitis A, B, C, and delta viruses among patients with acute hepatitis in Mongolia. J Med Virol, 2006. 78: p 542-50.
20. D. Vincenti, M. Solmone, A. R. Garbuglia, F. Iacomi, M. R. Capobianchi. A sensitive direct sequencing assay based on nested PCR for the detection of HBV polymerase and surface glycoprotein mutations. Journal of Virological Methods ,2009. 159: p. 53–57.

ФАРМАКОГЕНОМИКА – ПУТЬ К ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

А.Н. Искакова
бакалавр, мнс, РГП «Национальный центр биотехнологий РК» КН МОН РК, г. Астана

А.А. Романова
бакалавр, лаборант, РГП «Национальный центр биотехнологий РК» КН МОН РК, г. Астана

С.Е. Рахимова
к.б.н., снс, РГП «Национальный центр биотехнологий РК» КН МОН РК, г. Астана

Е.М. Раманкулов
Phd, генеральный директор, РГП «Национальный центр биотехнологий РК» КН МОН РК, г. Астана

Аннотация

Фармакогеномика – одно из новых направлений современной науки. Результаты фармакогеномических исследований могут быть использованы в развитии персонализированной медицины. Одним из ярких примеров персонализированного подхода к дозированию лекарственного препарата на основе генотипа человека является антикоагулянт непрямого действия – Варфарин.

Фармакогеномика – қазіргі заманғы ғылымның бір бағыты. Фармакогеномикалық зерттеулердің нәтижелерін жекелендірілген медицинада қолдануға болады. Осындай жекелендірілген түрде адам генотипі негізінде емдік препараттарды мөлшерлеудің мысалы тікелей емес әсерлі антикоагулянт – Варфарин болып табылады.

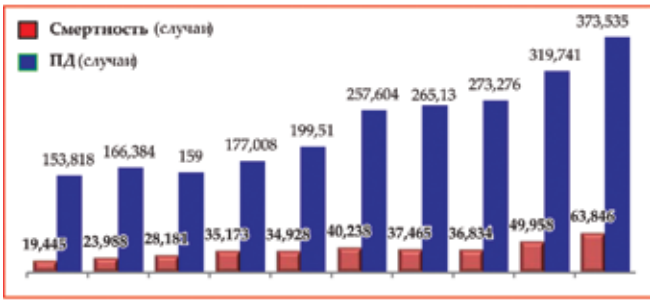
Pharmacogenomics is one of the new areas of modern science. Results of farmakogenomičeskih researches can be used in the development of personalized medicine. A prominent example of a personalized approach to dosing of a drug based on the genotype is an anticoagulant of indirect actions is Warfarin.

Ключевые слова: Фармакогеномика, Варфарин, CYP2C9, VKORC1, тромбозы

Введение

На сегодняшний день проблема правильной дозировки лекарственных средств является крайне актуальной для всех стран. Общеизвестно, что многие лекарственные препараты имеют побочные действия, или так называемые, нежелательные лекарственные реакции. Согласно данным Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA, USA) количество случаев возникновения побочных реакций в США на 2009 год возросло до 373, 535 (Рисунок 1). Ситуация в Казахстане не является исключением. Так, согласно данным Национального центра экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники на период с мая 2005 года по февраль 2007 года количество случаев побочных действий от препаратов для лечения ЦНС достигает 38%, от противотуберкулезных препаратов – 21%.

Рис. 1. Количество случаев возникновения побочных действий лекарств в США (по годам) («AERS Patient Outcomes by Year» Food and Drug Administration (Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, March 31, 2010)



Однако, не у всех эти нежелательные лекарственные реакции проявляются именно побочными действиями. Часто возникают ситуации, когда препарат не оказывает ожидаемого эффекта на пациента. Это сейчас мы знаем, что для правильного лечения препаратами, т.е. для «правильной» дозировки необходимо учитывать многие факторы, такие как вес, возраст и др., а в недалеком прошлом «правильная» дозировка лекарственного препарата вызывала огромные затруднения для врачей.

Биотрансформация ксенобиотиков. Биотрансформация ксенобиотиков, к которым относятся и лекарственные средства, представляет собой принципиальный механизм поддержания гомеостаза во время воздействия на организм чужеродных соединений. В системе биотрансформации принято выделять две фазы метаболизма. К 1-й фазе относятся реакции гидролиза, восстановления и окисления субстрата. Среди ферментов 1-й фазы ведущее место занимает система цитохрома P450 (P450 или CYP) с точки зрения каталитической активности в отношении огромного числа ксенобиотиков. Наибольшая концентрация цитохрома P450 обнаруживается в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов (микросомах). Печеночные микросомальные цитохромы P450 играют важнейшую роль в определении интенсивности и времени действия чужеродных соединений и ключевую - в

детоксикации ксенобиотиков, а также в активации их до токсичных и/или канцерогенных метаболитов.

Ко второй фазе биотрансформации ксенобиотиков (II фаза) относятся реакции глюкуронидации, сульфатирования, ацетилирования, метилирования, конъюгации с глютатионом (синтез меркаптуровой кислоты) и конъюгация с аминокислотами, такими как глицин, таурин, глутаминовая кислота. Кофакторы этих реакций реагируют с функциональными ферментами 1-й фазы. За исключением метилирования и ацетилирования, реакции 2-й фазы приводят к значительному увеличению гидрофильности ксенобиотика, что способствует их экскреции из организма. Большинство ферментов 2-й фазы локализовано в цитозоле, кроме уридиндифосфоглюкуронозилтрансфераз (УДТ), которые являются микросомальными. Реакции 2-й фазы обычно протекают намного быстрее, чем реакции 1-й фазы, катализируемые цитохромом Р-450. Поэтому скорость элиминирования ксенобиотика в большой степени зависит от скорости, с которой протекает реакция 1-й фазы (Райс Р.Х., Гуляева Л.Ф., 2003).

Варфарин – «классический» пример рационализации приема лекарственных средств. Варфарин - антикоагулянт непрямого действия из ряда кумаринов. Это средство, применяемое для лечения и профилактики тромбозов и тромбоэмболий, вызывает ряд побочных эффектов, наиболее тяжелым из которых являются кровотечения различной локализации.

Как выше уже было упомянуто, для расчета оптимальной дозировки лекарственных средств необходимо учитывать такие факторы, как вес, возраст, этическая принадлежность, терапия лекарственными препаратами и генетические особенности. В случае Варфарина, вклад генетических особенностей при расчете дозировок составляет почти 50%. Для того, что бы понять какие гены отвечают за метаболизм Варфарина, необходимо немного разобраться в механизме действия.

При норме в коагуляционном каскаде II, VII, IX, X факторы крови подвергаются γ- глутамил-карбоксилированию, т. е. при участии фермента γ-глутамилкарбоксилазы (GGCX) данные факторы крови из неактивного состояния переходят в функционально активное. В результате, происходит снижение витамин K гидроксихинона ($VitKH_2$), так как последний используется в качестве источника протонов реакции карбоксилирования. Побочным продуктом реакции карбоксилирования является витамин K - эпоксид, который при участии фермента VKOR снова превращается в $VitKH_2$, который необходим для формирования активных коагуляционых факторов. Действие Варфарина заключается в ингибировании фермента VKOR, т.е. мультипротеиновый комплекс витамин K эпоксид – редуктазы является молекулой-мишенью Варфарина. Сам же Варфарин метаболизируется ферментами системы цитохромов Р 450. Основная форма S-Варфарина метаболизируется ферментом CYP2C9, форма R-Варфарина – ферментами CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4. Так же имеются сведения об участии в метаболизме Варфарина фермента CYP4F2. Физиологическая роль CYP4F2 в биотрансформации варфарина неизвестна.

Известно, что от определенных полиморфизмов единичного нуклеотида (single nucleotide polymorphisms, SNP) генов, продуцирующих данные ферменты, зависит активность одноименных ферментов. В зависимости от реакции организма на терапию лекарственными препаратами, т.е. на основании того, как ферменты метаболизируют лекарственное средство, разделяют 4 типа метаболизма лекарственных средств: «медленные метаболизаторы» (poor metabolizer, PM), «промежуточные метаболизаторы» (intermediate metabolizer, IM), «экстенсивные метаболизаторы» (extensive metabolizer, EM) и в некоторых случаях «сверхактивные метаболизаторы» (ultraextensive, UM). Так, в случае, если у пациента «медленный» метаболизм, то стандартная терапевтическая дозировка Варфарина будет вызывать токсическое действие. В случае «сверхактивного» метаболизма стандартная терапевтическая дозировка не будет успевать оказывать ожидаемого лечебного эффекта. Для такого пациента необходимо значительно повышать дозировку или подбирать лекарственное средство, метаболизируемое иными ферментами.

То, каким метаболизмом обладает человек можно определить заранее, до приема лекарственных средств, на основании генотипа генов, продуцирующих вышеуказанные ферменты. Установлено, что генами, ассоциированными с дозировкой Варфарина, являются *CYP2C9, CYP4F2, GGCX* и *VKORC1*, что вполне согласуется с механизмом действия и биотрансформацией Варфарина.

Алгоритмы расчета дозировки Варфарина. Существует несколько подходов к расчету оптимальной дозировки Варфарина, основанных на фармакогенетических исследованиях.

На основе генотипа и физикальных характеристик Sconce EA и соавт. (2005) была разработана математическая формула расчета начальной дозы Варфарина, в которой учитывались такие параметры, как возраст, рост и данные генотипирования *CYP2C9*2, CYP2C9*3* и *VKORC1*.

*Начальная доза Варфарина (мг/сут)=[0,628-0,0135×возраст (лет)-0,24×CYP2C9*2-0,37×CYP2C9*3-0,241×VKORC1+0,0162×рост(см)]*

где:

- CYP2C9 в зависимости от генотипа равен 1 при гетерозиготном носительстве аллельных вариантов соответствующих аллельных вариантов (генотипы *CYP2C9*1/*2* или *CYP2C9*1/*3*), а при гомозиготном носительстве (генотипы *CYP2C9*2/*2* или *CYP2C9*3/*3*) равен 2;
- показатель VKORC1 (1639 G>A) для GG -1, AG – 2 и AA – 3.

Группой авторов Gage BF (2008) была предложен алгоритм, в котором учитывались такие параметры, как возраст, расовая принадлежность, пол, значение целевого МНО, площадь поверхности тела (исходя из роста и веса), взаимодействие Варфарина с Амиодароном и статинами, и данные генотипирования *CYP2C9*2, CYP2C9*3*.

*Начальная доза Варфарина (мг/сут)= exp(0,385-0,0083×возраст(лет)+0,498×ППТ-0,208×CYP2C9*2-0,350×CYP2C9*3-0,341×(амиодарон)+0,378×целевое МНО-0,125×(статин)-0,113×(раса)-0,075×(женский пол)*

где:

ППТ = вес (кг) 0.425 × рост (см) 0.725 × 0.007184. Если пациент принимает амиодарон или статин (флувастатин или симвастатин), в формулу подставляется 1, если нет – 0. Тоже касается и совместного применения амиодарона. Если больной относится к европеоидной расе, в формулу необходимо подставить 1, для представителей других рас - 0; если расчет дозы Варфарина ведется для женщины, необходимо подставить 1, для мужчины – 0 (Сычев Д.А., 2007, с.59-66).

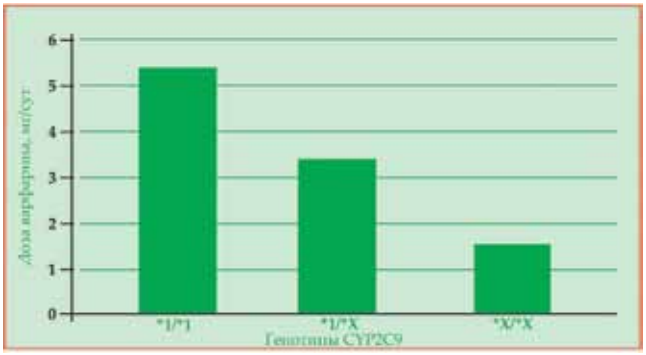
Anderson JL и соавт. (2007) была предложена формула, в которой учитывались возраст, пол, вес и данные генотипирования *CYP2C9*2, CYP2C9*3* и *VKORC1* для расчета еженедельной дозы.

Еженед.доза=1,64+exp_e [3,984+CYP*1*1(0)+CYP*1*2(-0,197)+CYP*1*3(-0,360)+CYP*2*3(-0,947)+CYP*2*2(-0,265)+CYP*3*3(-1,892)+VKORC1-CT(-0,304)+VKORC1-TT(-0,569)+VKORC1-CC)(0)+возраст(-0,009)+мужской пол(0,094)+женский пол(0)+вес(кг)(0,003)

На основании этих и др. исследований на сайте www.warfarindosing.org был разработан алгоритм расчета дозировки Варфарина, учитывающий все вышеперечисленные параметры.

Более простой алгоритм был предложен M.Moridani и соавт. (2006). Авторы рассчитали средние рекомендованные начальные дозы Варварина для пациентов разных этнических групп и разных патологий в зависимости от результатов фармакогенетического тестирования по CYP2C9 (Рисунок 2). Для получения начальной дозы Варварина вместо X необходимо подставить *2 или *3, в зависимости от соответствующего выявленного генотипа.

Рис. 2. Дозы Варфарина в зависимости от результатов фармакогенетического тестирования по CYP2C9



Немного другой подход к дозированию Варфарина предложили Peyvandi F и соавт. (2004). Он заключается в том, что необходимо проводить коррекцию дозировки Варфарина на основе генотипа человека после назначения стандартной дозы.

Заключение. Использование методов персонализированной медицины значительно сокращает время подбора оптимальной дозы и количество случаев нежелательных побочных реакций, т.е. повышается качество и уровень жизни пациентов. При активном использовании фармакогенетических методов наряду с огромным социальным эффектом, будет оказываться и значительный экономический эффект. Расчет персональных эффективных доз лекарственных препаратов приводит к снижению побочных эффектов и экономических расходов, связанных с неоправданным использованием универсальных доз (неоправданный расход лекарственных препаратов при лечении основного заболевания, расход средств на дополнительное лечение от воздействия побочных эффектов, возникших при лечении основного заболевания). Т.о., грамотный индивидуальный подход к дозированию медикаментов окажет сберегающий эффект на бюджет здравоохранения. Кроме того, данные фармакогенетических исследований определяют возможность второй жизни препаратов, не прошедших клинические испытания и отозванных с рынка, а также возможность избежать отзыва продаваемых препаратов с рынка.

Из всего вышеизложенного следует, что необходимо наряду с методами «классической» медицины применять и современные молекулярно-генетические методы при определении оптимальной дозировки лекарственного средства, т.е. использовать системы подбора индивидуальных доз лекарственных препаратов.

Литература

1. Акильжанова А.Р., Жолдыбаева Е.В., Кожахметова С. С. и др. Генетический паспорт – миф или реальность // Астана медициналык журналы. – 2010. - №4(62). – С. 23-27
2. Искакова А. Н., Романова А. А., Кожахметова С. С. и др. Полиморфизм гена GSTP1 в казахской популяции, Биотехнология. Теория и практика, 2011 – Номер 3, С. 53-57.
3. Райс Р.Х., Гуляева Л.Ф. Биологические эффекты токсических соединений. Курс лекций. Новосибирск, 2003
4. Сычев Д.А., Антонов И.М., Загребин С.В. и др. Алгоритмы дозирования варфарина, основанные на результатах фармакогенетического тестирования: реальная возможность оптимизации фармакотерапии. РФК 2007; 2:59-66
5. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM et al. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. Circulation 2007;116:2563-70.
6. Gage B, Eby C, Johnson J, Deych E et al. Use of Pharmacogenetic and Clinical Factors to
1. Predict the Therapeutic Dose of Warfarin. Clin. Pharmacol. Ther. 2008
7. Moridani M, Fu L, Selby R, Yun F et al. Frequency of CYP2C9 polymorphisms affecting
2. warfarin metabolismin a large anticoagulant clinic cohort. Clin Biochem. 2006; 39(6): 606-12.
8. Moyer TP, O'Kane DJ et al. Warfarin Sensitivity Genotyping: A Review of the Literature
3. and Summary of Patient Experience. Mayo. Clin. Proc. December 2009; 84(12):1079-1094
9. Peyvandi F, Spreafico M, Siboni SM et al. CYP2C9 genotypes and dose requirements
4. during the induction phase of oral anticoagulant therapy. Clin. Pharmacol. Ther. 2004;75(3):198-203.
10. Roper N, Storer B, Bona R, Fang M. Validation and comparison of pharmacogenetic-
5. based Warfarin dosing algoritms for applications of pharmocogenetic testing. Journal of Mol. Diagostics 2010, Vol.12(3)
11. Sanderson S, Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in
6. warfarin-treated patients: a HuGEnet systematic review and meta analysis. GenetMed. 2005; 7(2): 97-104.
12. Schelleman H, Chen J, Chen Zh et al. Dosing algorithms to predict Warfarin maintenance
7. dose in Caucasians and African Americans. Clin. Pharmacol. Ther. 2008; 84(3): 332-339
13. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic
8. polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. Blood 2005;106:2329-33.

14.Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA et al. Different contributions of polymorphisms
9. inVKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. Pharmacogenet. Genomics. 2006; 16(2): 101-10.
15.Ventola CL. Pharmacogenomics in clinical practice. Reality and expectations. P&T 2011;
10.Vol. 36 (7)
16.http://pharmsuite.ru/web2/
11.http://www.warfarindosing.org
12.http://www.fda.gov/

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Д.Ч. Уразбаева, У.Л. Орумбаева, А.А. Клодзинский, Е.В.Овчаренко

Республиканский диагностический центр, г.Астана

Аннотация

Представлен анализ результатов исследований проведенных в Центре лабораторной медицины Республиканского диагностического центра (РДЦ) с ноября 2010 года по ноябрь 2011 год

Provides an overview of the results of research carried out in laboratory medicine of the Republican diagnostic centre (ACC) since November 2010, to November 2011 year

Ключевые слова: Иммунофенотипирование, проточная цитометрия, острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластные лейкоз.

Актуальность

Совершенствование методов современной терапии лейкозов определяет необходимость более точной и точечной идентификации лейкозных клеток.

Иммунофенотипирование (ИФТ) – это способ определения фенотипа клеток методом проточной цитометрии. Ранее используемые методы, например, цитологический не представляют возможным определить клональность и стадию дифференцировки клеток. Ограничением иммуногистохимии является трудность проведения мониторинга эффективности терапии.

Преимуществом проточной цитометрии является исследование большого количества клеток, одновременное изучение нескольких антигенов на одной клетке, как на поверхности, так и в цитоплазме клетки. Перечисленное достоинство этого метода позволяет использовать его в онкогематологии с целью диагностики и прогноза заболеваний, мониторирования терапии острых лейкозов и определяет спектр маркеров для исследования минимальной остаточной болезни (МОБ) в последующем.

Целью исследования является анализ результатов проводимых исследований в Центре лабораторной медицины Республиканского диагностического центра (РДЦ) с ноября 2010 года по ноябрь 2011 год.

Материалы и методы исследования

Было обследовано 53 взрослых пациента в РДЦ г.Астаны. Биологический материал - костный мозг был получен из отделения онкогематологии Республиканского научного центра неотложной медицинской помощи и из других регионов Республики Казахстан.

Иммунофенотипирование проводилось методом прямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител фирмы Becton Dickinson (USA) на аппарате Facs Calibur, имеющем 3 канала светорассеяния: Fitc, Pe, PerCp.

В соответствии с рекомендациями первой Европейской группы по иммунологической классификации лейкозов (European Group for the Immunological Characterization of Leukemia [1] иммунологическое фенотипирование проводилось в два этапа:

I этап - скрининг, определение клональности опухолевых клеток. Панель состоит из следующих маркеров: CD7/CD19/CD45, CD34/CD117/CD45.

II этап - зависел от результатов первого этапа. С целью уточнения варианта острого лейкоза (ОЛ) и степени дифференцировки Т- или В-клеток острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), использовали соответствующую панель в комбинации. Для определения миелоидных маркеров и исключения абберантного фенотипа: G1/G2/CD45, CD15/CD14/CD45, CD34/CD33/CD45, HLA-DR/CD13/CD45, CD38/CD117/CD45, MPO/CD34/CD45, CD4/CD8/CD45, CD2/CD79a/CD45, CD34/CD3(kcyt)/CD45, CD7/CD19/CD45, CD2/CD11C/CD45.

Для определения Т-клеточных маркеров и исключения абберантного фенотипа: CD7/CD3/CD45, CD7/CD3(cyt)/CD45, CD2/CD8/CD45, CD4/CD1a/CD45, HLA-DR/CD34/CD45, TDT/CD5/CD45, CD5/CD33/CD45, CD7/CD13/CD45, MPO/79a/CD45.

Для определения В-клеточных маркеров: CD5/CD23/CD19, CD22/CD10/CD19, CD25/CD79b/CD19, FMC7/CD23/CD19, K/Λ/CD19, CD25/CD103/CD19, CD11c/CD103/CD19 [2].

Результаты исследования

С помощью проточной цитометрии проведено исследование 53 проб костного мозга, полученного от взрослых больных с диагнозом острый лейкоз. Из них мужчин 60,6%, женщин-39,4%. Средний возраст составил у мужчин 49лет, у женщин 40лет.

По результатам наших исследований установлено, что наибольшее количество пришлось на долю больных с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) - 79,2% . Небольшую группу составил острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ)- 20,8%.

По результатам ИФТ больных распределили по следующим нозологическим формам:

Таблица 1. Частота выявления различных иммунологических вариантов острых лейкозов

ОМЛ			ОЛЛ		
Вариант по Fab-классификации	M±m %	Количество больных	Вариант по Fab-классификации	M±m %	Количество больных
M0	15,1±2,0	8	B-II	18,2±7,4	2
M1	18,8±1,9	10	B-III	54,6±4,1	6
M2	35,7±1,5	15	T-I	9,1±8,3	1
M3	4,7±2,3	2	T-II	9,1±8,3	1
M4	16,7±2,0	7	T- III	9,1±8,3	1

Наиболее часто среди ОМЛ выявлялись варианты с признаками созревания М2- 35,7±1,5% и без признаков созревания М1-18,8±1,9. Мы их отнесли в одну группу. Группа недифференцированных лейкозов составила 15,1±2,0 %. В небольшую группу мы отнесли острые миеломонобластные лейкозы - 16,7±2,0%. Самая малочисленная группа - острый промиелоцитарный лейкоз составил 4,7±2,3.

Одним из критериев, характеризующих бластные клетки, является коэкспрессия антигенов нескольких линий, т.е. клетки, имеющие на своей поверхности или в цитоплазме антигены разных гемопоэтических линий. Например, экспрессия лимфоидных антигенов при ОМЛ или миелоидных маркеров при ОЛЛ.

Коэкспрессия антигенов нескольких линий была выявлена в 21,4% случаев. Из них с коэкспрессией CD7: при М0 варианте -37,5±4,1%, при М1 - 12,5±4,7%. Коэкспрессия CD19 выявлена при М2 варианте ОМЛ в 26,6±2,0% случаев, коэкспрессия CD4 при М4 варианте ОМЛ составила 28,6±4,2%.

В ходе проведенных нами исследований в 3,8±1,8% случаях выявлен острый лейкоз смешанного фенотипа.

Клинический случай

Больная К., 66 лет.

Миелограмма: В пунктате костного мозга тотальная бластная инфильтрация. Бласты малых и средних размеров, округлой формы. Ядерно-цитоплазматическое соотношение высокое. Хроматин нежно-сетчатой структуры.

Цитохимическое исследование на миелопероксидазу и липиды –отрицательно.

Иммунофенотипирование костного мозга. При исследовании были выявлены клетки со сниженной экспрессией CD45 - 90%, со следующим иммунофенотипом (таблица 2):

Таблица 2. Иммунофенотип больной К.

Маркер	Количество (%)	Маркер	Количество (%)
CD34	92	CD15	14
CD117	62	CD14	0
CD33	82	МПО	0
CD13	81	HLA-DR	20
CD79a	0	CD7,2,4,3	0

В результате проведенного исследования характерный иммунофенотип позволил предположить наличие острого миелобластного лейкоза, по Fab-классификации наиболее вероятен вариант М0.

При анализе экспрессии маркеров при миелобластном лейкозе отмечалось, что уровень ранних маркеров CD34 и наиболее специфичного миелоидного маркера CD117 высока при недифференцированном варианте ОМЛ. Экспрессия CD33 гомогенна на всех лейкозных бластах. Уровень CD13 выявляется на всех лейкозных бластах, но уровень её неоднороден. Уровень внутриклеточной миелопероксидазы и CD15 варьирует от слабой экспрессии при М0 варианте, до высокой у более «зрелых» иммунологических вариантах.

Результаты и обсуждение

Таким образом, по данным иммунофенотипирования в структуре иммунологических вариантов ОЛ среди взрослого населения наиболее часто встречается острый миелобластный лейкоз, относящийся по Fab-классификации к варианту М2. Коэкспрессия неродственных антигенов выявлена в 21,4% случаев. Наиболее часто встречаемый Т-клеточный антиген CD7. Значительно реже среди взрослого населения выявлялся острый лимфобластный лейкоз.

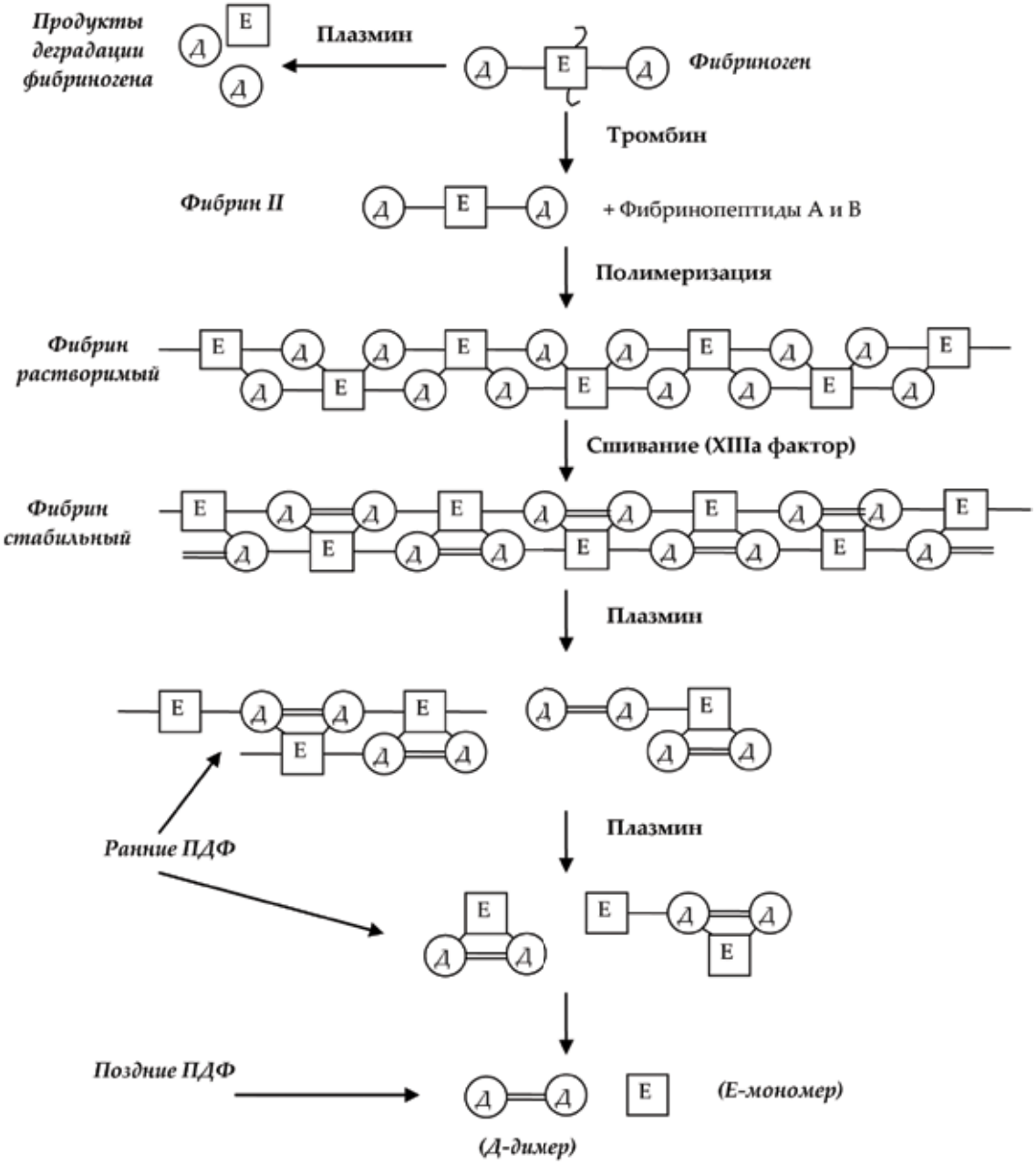
Литература

1. Leukemia. – 2001, № 5(10).- P. 1673-11.
2. Диагностика болезней крови. Учебно-методическое пособие//Под редакцией профессора И.В. Маева. – М., ВУНМЦМЗРФ. - 2002г. - 64с.
3. Тупицын Н.Н. Иммунодиагностика гемобластозов // Клиническая онкогематология. –М., 2001.
4. Проточная цитометрия в медицине и биологии// Справочник. – Алматы, 2011.
5. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тупицын Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов - М., 2001.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ И КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТА Д-ДИМЕР*

D-димер – специфический ***продукт деградации поперечно-сшитого (нерастворимого) фибрина***. Уровни содержания D-димера обычно повышены, как у пациентов с острой венозной тромбоэмболией, так и у пациентов с целым рядом состояний, не связанных с тромбами (например, после недавнего значительного хирургического вмешательства, кровотечений, травм, беременности, онкологических заболеваний). Тест на Д-димер позволяет обнаружить продукты деградации фибрина, которые содержат поперечные Д=Д связи. Увеличение концентрации Д-димеров в плазме свидетельствует с одной стороны об активации процесса образования фибрина (*тромбоз*), а с другой стороны о разрушении стабильного фибрина. Анализ на D-димер является наиболее значимым при его отрицательном результате, указывающем на низкую вероятность ТГВ или ТЭЛА, таким образом, D-димер является хорошим тестом на "исключение диагноза" при проведении соответствующей предтестовой вероятности. Включение тестов на D-димер в алгоритмы диагностики, при правильном применении этих тестов, упрощает ведение пациентов с подозрением на ТГВ и ТЭЛА.

Схема 1. Образование д-димеров



Диагностика тромбоэмболии легочной артерии и тромбоза глубоких вен

По данным МЗ РФ ТЭЛА является наиболее частой «неакушерской» причиной материнской смертности. Смертность от этого осложнения колеблется от 0,5 до 3 на 1000 беременных, а в структуре материнской смертности составляет 2,8–9,2%. ТЭЛА в 40 % случаев является причиной смерти после гинекологических операций.

Диагностика ТЭЛА и тромбоза глубоких вен (ТГВ), основанная лишь на клинической картине, в большинстве случаев крайне затруднительна и подтверждается объективными методами исследования только у 15-35% пациентов с первоначальным подозрением на это заболевание. В группе беременных этот процент значительно ниже.

Большинство применяющихся на сегодняшний день методов диагностики венозного тромбоэмболизма несовершенны и их клиническая ценность при изолированном использовании низка. Практически все инструментальные методы связаны с радиационной нагрузкой и риском для плода, что делает их применение в акушерстве малоприемлемыми. Выполнение референтного метода диагностики ТЭЛА – ангиопульмонографии связано с опасностью осложнений, в связи с этим клиницисты крайне неохотно идут на эту процедуру. Кроме того, проведение инструментальных методов исследования в большинстве своем недоступно в реальных условиях центральной районной больницы.

Измерение концентрации Д-димеров в крови является наиболее приемлемым и эффективным неинвазивным диагностическим тестом при ведении пациентов с подозрением на наличие тромбоза глубоких вен и тромбоэмболии легочной артерии.

На основании результатов многочисленных исследований показано:

1. В реальной клинической практике следует использовать только **количественные тесты,** причем их отрицательная диагностическая значимость для исключения ТЭЛА и ТГВ должна быть не менее 98% определения Д-димеров, поскольку каждое снижение чувствительности теста Д-димера на 2% может оказаться значимой причиной повышения смертности среди пациентов с подозрением на ТЭЛА.
2. Тест Д-димеры (**Helena Auto-Blue D-dimer 400**) обладает высокой отрицательной диагностической значимостью для венозного тромбоэмболизма – уровни Д-димеров в плазме менее 200 нг/мл исключает наличие у пациента тромбоза более 98-100%.
3. Применение теста Д-димеры (**Helena Auto-Blue D-dimer 400**) в качестве скринингового в группе пациентов с подозрением венозного тромбоэмболизма позволяют исключить этот диагноз на начальном этапе более чем в 35% случаев.

Аналитический метод определения Д-димеров реализованный в **приборе С1** (HELENA BIOSCIENCES) характеризуется:

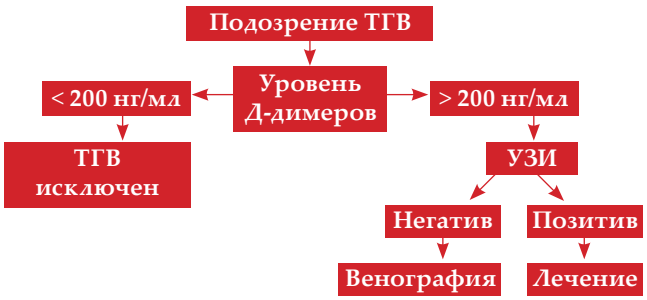
1. Высокой диагностической эффективностью для исключения ТЭЛА и ТГВ.
2. Высокой скоростью получения результата, простотой в исполнении и
3. Экономической доступностью оборудования для ЛПУ любого уровня.

Определение концентрации Д-димеров является первым диагностическим шагом при подозрении у пациента ТЭЛА. В случае значений Д-димера **(Helena Auto-Blue D-dimer 400)** менее 200 мг/мл диагноз ТЭЛА исключается. При уровне более 200 нг/мл и высокой клинической вероятности ТЭЛА начинают специфическую терапию.

Схема 2. Исключение тромбоэмболии легочной артерии (тэла)

Принцип применение теста Д-димеров для исключения тромбоза глубоких вен тот же, что и в случае ТЭЛА. Уровень Д-димера (**Helena Auto-Blue D-dimer 400**) менее 200 нг/мл исключает наличие ТГВ в 98-100% случаев.

Схема 3. Диагностика тромбоза глубоких вен (ТГВ)



Применение теста Д-димер в диагностике и ведении пациентов с синдромом ДВС

На сегодняшний день среди прямых причин материнской смертности лидирует синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания, развивающийся вследствие кровотечения, гестоза и родового сепсиса, а также целого ряда других грозных акушерских осложнений. Высокая летальность, обусловлена с одной стороны сложностью ранней диагностики ДВС, а с другой – проблематичностью эффективного лечения на тех стадиях этого синдрома, когда диагноз не вызывает сомнений. Большинство лабораторных тестов, направленных на выявление синдрома ДВС, обладает низкой чувствительностью и позволяет диагностировать патологию на поздней стадии (например, удлинение теста АЧТВ, снижение уровня фибриногена и числа тромбоцитов). Одним из наиболее перспективных тестов в плане раннего выявления ДВС является определение уровня Д-димеров в плазме пациента. Специфичность и чувствительность Д-димеров для диагностики ДВС значительно превышает таковую для традиционных тестов оценки гемостаза. Это подтверждают клинические исследования, которые убедительно документируют рост уровня Д-димеров практически у всех больных с ДВС.

Схема диагностики акушерского синдрома ДВС

Предлагается двухэтапная схема диагностики:

Клинический этап.

На клиническом этапе проводится оценка клинической вероятности развития ДВС у пациентки.

1. Выявление у пациентки патологии, ассоциированной с высоким риском развития синдрома ДВС:
1.1. Преждевременная отслойка плаценты;
1.2. Эмболия околоплодными водами;
1.3. Сепсис и септические состояния;
1.4. Акушерские кровотечения с патологической кровопотерей;
1.5. Синдром внутриутробной гибели плода;
1.6. Внутрисосудистый гемолиз любой этиологии;
1.7. Поздние осложненные гестозы.
2. Осложнения, являющиеся следствием основного заболевания, ассоциированного с высоким риском развития синдрома ДВС:
2.1. Признаки шока.
2.2. Синдром органной дисфункции.
3. Клинические признаки нарушения гемостаза: макрогематурия, мелена, пурпура, кровоизлияния в слизистые оболочки, кровоточивость и гематомы в местах инъекций.

Интерпретация:

А. В случае наличия у пациентки патологии из п.1 клиническая вероятность оценивается как умеренная.

Б. При наличие патологии из п.1 и п. 2 клиническая вероятность оценивается как высокая.

В. При наличии патологии из пп. 1, 2 и 3 клиническая вероятность оценивается как очень высокая.

При очень высокой клинической вероятности синдрома ДВС диагноз выставляется сразу, и начинают терапевтические мероприятия. Лабораторные исследования в этом случае нужны для осуществления контроля эффективности лечения.

Лабораторный этап.

Первым тестом, который необходимо провести – измерение уровня Д-димеров в плазме пациентки. Далее в зависимости от результатов принимают диагностическое решение (алгоритм 1).

Интерпретация:

А. Уровень Д-димеров менее 1000 нг/мл диагноз ДВС исключается.

В. Уровень Д-димеров более 1000 нг/мг и менее 2400 нг/мл на фоне высокой клинической вероятности и патологически измененных результатах рутинных коагулологических тестов (АЧТВ, ПВ, тромбоциты и фибриноген) необходимо повторить исследование Д-димеров, а также АЧТВ, ПВ, уровня тромбоцитов и фибриногена через 3 часа.

Г. При умеренной и высокой клинической вероятности, а уровне Д-димеров ≥2400 нг/мл, но <5000 нг/мл свидетельствует в пользу гиперкоагуляционной фазы ДВС. В этом случае лечение проводят консервативно, а к терапии следует добавлять низкомолекулярный гепарин, особенно при септических состояниях, преждевременной отслойке плаценты и др.

Д. При умеренной и высокой клинической вероятности ДВС и значениях Д-димеров более 5000 нг/л на фоне сдвигов в показателях рутинной коагулограммы, свидетельствующих в пользу гипокоагуляции, выставляется диагноз гипокоагуляционная фаза ДВС. В этом случае проводят интенсивную заместительную терапию, контролируя уровень Д-димеров.

Е. При очень высокой клинической вероятности синдрома ДВС сразу выставляется диагноз ДВС фаза гипокоагуляции и проводится соответствующая терапия вплоть до гистерэктомии. Уровень Д-димеров отслеживают для оценки эффективности терапии и при его нарастании на фоне консервативной терапии необходимо использовать хирургические методы лечения.

Алгоритм 1. Диагностика ДВС синдрома

Контроль эффективности проводимых терапевтических мероприятий по поводу ДВС (алгоритм 2).

При установленном диагнозе синдрома ДВС повторные определения уровня Д-димеров проводят через 3 часа от начала терапевтических мероприятий.

Оптимальным критерием для оценки терапии как успешной является уменьшение уровня Д-димеров через три часа терапии на 40% и более. Если через 3 часа после начатой терапии уровень Д-димеров уменьшился менее чем на 20% от исходных значений, лечение считается не эффективным. Диапазон снижения Д-димеров более 20% и менее 40% по сравнению с исходными уровнями через 3 часа терапии позволяет оценивать успех лечения как умеренный.

Алгоритм 2. Оценка эффективности терапии ДВС синдрома.

Применение теста Д-димер в диагностики причин продолжающегося кровотечения

Определение уровня Д-димеров позволяет проводить дифференциальную диагностику причины продолжающегося кровотечения (алгоритм 3). Например, если на фоне кровотечения концентрация Д-димеров менее 1000 мг/мл и нормальных результатах тестов рутинной коагулограммы (ПТИ/МНО, АЧТВ, тромбоциты, фибриноген), то в первую очередь необходимо исключать хирургическую причину кровотечения, в случае послеродового кровотечения необходимо исключить акушерскую причину (нарушение целостности сосуда или атоническое кровотечение).

При патологических результатах коагулограммы и нормальных уровнях Д-димеров (менее 1000 нг/мл) необходимо вести диагностический поиск в сторону выявления не связанных с синдромом ДВС коагулопатий (дефицит факторов (ингибиторные формы гемофилии), прием антикоагулянтов, патологии тромбоцитов и т.п.).

Алгоритм 3. Диагностики причин продолжающегося кровотечения

Применение теста Д-димер для мониторинга гепаринотерапии и гепаринопрофилактики

Кроме диагностики ТГВ и ТЭЛА тест Д-димеры имеет прогностическое значение для антикоагуляционной терапии гепарином. Клинические исследования показывают, что критерием эффективного лечения гепарином, является снижение концентрации Д-димеров в крови. Это имеет существенное значение для оценки регрессии тромбоза. Нормализация концентрации Д-димеров в плазме больных, получавших лечение гепарином, отражает процесс регрессии тромбоза; сохраняющаяся высокая концентрация Д-димеров или ее рост (в процессе лечения) является показателем неблагоприятного исхода.

Необходимо подчеркнуть, что Д-димеры являются прогностическим маркером в мониторинге антикоагуляционной терапии гепарином всех клинических состояний, сопровождающихся риском тромбоза.

Концентрация Д-димеров коррелирует с частотой послеоперационных тромботических осложнений.

Ориентируясь на концентрацию Д-димеров у пациентов после операции, выбирают тактику профилактических мероприятий по предотвращению постоперационных тромботических осложнений. Наибольшая частота послеоперационных тромбозов приходится на вторые сутки после операции.

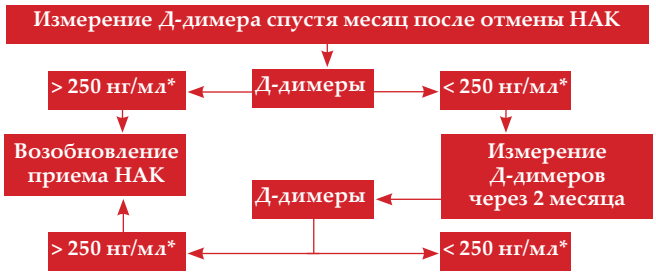
Рекомендуемый режим назначения теста Д-димер у пациентов хирургического профиля:

1. Предоперационный скрининг: определяют уровень Д-димеров, в группе пациентов с риском тромбозов в послеоперационном периоде (опасная в плане тромбоза операция, злокачественные образования, тромбофилии и т.п.). При концентрациях Д-димеров более 500 нг/мл следует проводить антитромботические профилактические мероприятия до тех пор, пока значения Д-димеров не станут меньше диагностического критерия.
2. Постоперационный скрининг: на вторые сутки после операции определяют уровень Д-димеров. При значениях более 500 нг/мл увеличивают дозу гепарина – переходя от профилактических доз к лечебным. Затем через сутки вновь оценивают уровень Д-димеров – при эффективной гепаринопрофилактике концентрация Д-димеров должна снижаться.

Определение уровня Д-димеров у пациентов, получающих пролонгированное антикоагулянтное лечение:

1. В случае длительного введения гепарина, например, у беременных с антифосфолипидным синдромом или другими тромбофилиями, уровень Д-димеров определяют спустя месяц от начала введения гепарина. Если концентрация Д-димеров более 250 нг/мл, дозу гепарина увеличивают и далее проводят ежемесячный контроль данного показателя.
2. Уровень Д-димеров у большинства больных, получающих непрямые антикоагулянты, обычно падает ниже порогового значения (менее 250 нг/мл) через 3 месяца (выраженности снижения зависит от индивидуальных особенностей пациента). Рекомендуемый срок контрольного измерения – через 3 месяца после начала терапии (Алгоритм 4).
3. При оценке продолжительности терапии непрямых антикоагулянтов уровень Д-димеров определяют спустя 1 месяц после отмены препарата. В случае если уровень Д-димеров более 250 нг/мл следует возобновить прием непрямых антикоагулянтов (Алгоритм 4).

Алгоритм 4. Применение Д-димеров для оценки эффективности и длительности терапии непрямыми антикоагулянтами (НАК)



* Значения Д-димера приведены для набора D-dimer Blue- 400 (Helena Bioscience)

По материалам компании Helena

ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА ЦОЙ И.Г.

Коллектив кафедры лабораторной диагностики и молекулярной медицины КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова с прискорбием извещает, что 28 февраля 2012 г. после тяжелой болезни, на 63-м году ушел из жизни выдающийся ученый и замечательный человек – Цой Игорь Гиленович, один из ведущих ученых нашей страны. В последние годы жизни он заведовал кафедрой лабораторной диагностики и молекулярной медицины КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова.

Цой И.Г. родился 4 марта 1949 г. в городе Акмолинске (ныне Астана) в семье врачей. В 1966 году после окончания средней школы Игорь Гиленович поступил на лечебный факультет Целиноградского государственного медицинского института Минздрава СССР, а в 1972 году окончил его с отличием. Именно тогда он начал свой плодотворный профессиональный путь стажером-исследователем в отделе аллергологии и иммунологии НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней (г. Алматы) под руководством ученого с мировым именем профессора Н.Д. Беклемишева. А закончил доктором медицинских наук, профессором, академиком Академии профилактической медицины (1995), лауреатом Государственной премии Республики Казахстан в области науки, техники и образования.

Игорь Гиленович являлся ведущим ученым страны в области клинической иммунологии и нутрициологии, автором ряда фундаментальных монографий. Неоднократно принимал участие в реализации международных научно-технических проектов ВОЗ, ЮНИСЕФ, ПРООН, международных и иностранных фондов США, Италии, Кореи, Китая в качестве координатора и ответственного исполнителя. С 2000 года являлся ответственным исполнителем научных проектов Республиканских программ фундаментальных исследований Министерства науки и образования РК, а также заказных НИР Министерства здравоохранения РК.

Цой И.Г. принимал активное участие в разработке и внедрении Национальной концепции здорового образа жизни и здорового питания, Национальной политики здорового питания Республики Казахстан, ряда законодательных актов и постановлений правительства, касающихся питания и здорового образа жизни, Республиканской программы по обогащению продуктов питания.

Являлся членом комиссии Высшего научно-технического Совета Министерства образования и науки Республики Казахстан, диссертационного совета по защите докторских диссертаций при Казахском национальном медицинском университете им. С.Д. Асфендиярова, главным редактором журнала «Здоровье и болезнь», заместителем главного редактора журнала научно-технического общества «КАХАК», членом редакционной коллегии журнала «Известия МОН РК и НАН РК», серии «Биология и медицина», правления Корейского научно-технического общества Казахстана «КАХАК».

Общее количество его научных трудов составило свыше 600, в том числе 12 монографий и 2 книги, 40 изобретений, подтвержденных охранными документами бывшего СССР и Республики Казахстан. Под его руководством защищено 90 диссертаций, в том числе 19 – докторских.

По оценке рейтинга цитируемости в 2009 году АО «Научный центр научно-технической информации» признан наиболее цитируемым за рубежом ученым-медиком, что позволяет по праву причислить его к ученым мирового уровня.

Игорь Гиленович, по всеобщему признанию, являлся не только специалистом самого высокого класса, беззаветно отдававшего себя служению медицине. В нем удивительным образом сочетались талантливый и энергичный ученый, незаурядная личность и необыкновенно скромный человек, отзывчивый и внимательный товарищ.

До последних дней Игорь Гиленович был преисполнен творческих планов по работе с новыми масштабными научными программами, вовлекая в них и коллектив кафедры.

Несмотря на краткий период пребывания на должности заведующего кафедрой, Игорь Гиленович не только расположил к себе весь коллектив кафедры, он активно вовлек сотрудников в новые научные работы, по мере сил оказывал помощь и поддержку.

Мы потеряли замечательного коллегу, учителя, друга, единомышленника.

Светлую память об Ученом, Организаторе, Человеке мы навсегда сохраним в наших сердцах, сердцах его коллег, соратников, учеников.

Коллектив кафедры лабораторной диагностики и молекулярной медицины КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова

КАМЛД

I НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЕ

КАМЛД 2012

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ
ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ КАЗАХСТАНА

www.kamld.kz

КАТАЛОГ ВЫСТАВКИ

sebia®
electrophoresis

minicap

автоматическая система капиллярного электрофореза

MEDILAND

Мы работаем в Казахстане и работаем для Вас!

050031, г. Алматы, пр. Райымбека / ул. Саина, 510-512/2 А
Тел:+7 (727) 238-08-55, 238-08-56, 238-08-57, факс: +7 (727) 238-01-64
e-mail: mail@mediland kz
www.mediland.kz

«АБРИС+», ООО НПФ

196143, Россия, Санкт-Петербург, пр. Ю.Гагарина, д. 65
Тел.: +7 (812) 327 64 75, 727 88 18, 726 85 02, 327 45 71
Факс: +7 (812) 327 64 75, 727 88 18, 726 85 02, 327 45 71
e-mail: abris@abrisplus.ru
www.abrisplus.ru

Научно-Производственная Фирма «АБРИС+» 20 лет на медицинском рынке России и стран СНГ. Производство высококачественных наборов реагентов для медицинских лабораторий:

1. Красители для гематологии «Диахим-ГемиСтейн»
2. Красители и наборы для цитохимии «Диахим-ЦитоСтейн»
3. Красители и наборы для микробиологии и клинического анализа крови
4. Современные наборы для клинической биохимии «Серия 300» для использования в лабораториях с любым уровнем оснащенности
5. Современные наборы для клинической биохимии «Серия Сапфир», разработанные специально для работы на автоматических анализаторах
6. Промывающие растворы для биохимических анализаторов
7. Калибровочные растворы
8. Наборы латекс-реагентов для экспресс-диагностики
9. Пакеты и емкости для сбора, хранения и утилизации медицинских отходов

«ADAMANT GROUP», ТОО

г. Алматы, ул. Шарипова, 90, офис 235/050012
Тел. +7 (727) 292 24 95
Факс +7 (727) 295 27 34
e-mail: Lab@adamant.kz
www.adamant.kz

Продажа и сервисное обслуживание медицинского оборудования.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРИЯ «TREEGENE»

050009 г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 305а
Тел. +7 (727) 391 19 06
Факс +7 (727) 241 61 25
e-mail: info@tree-gene.com
www.tree-gene.com

Генетическая лаборатория «TreeGene» специализируется на ДНК анализах для определения моногенных наследственных заболеваний, мультифакторных состояний (предрасположенности к заболеваниям), а также для раннего выявления патологий в пренатальной диагностике. Молекулярная диагностика, пришедшая на смену цитогенетическим методам, позволяет получать высокоточные результаты в сжатые сроки, и уже сегодня применяется в казахстанской науке и во врачебной практике.

Мы убеждены, что новые технологии в области диагностики, лечения и предотвращения болезней должны внедряться в жизнь и быть доступны каждому.

TreeGene – ответы для жизни.

«DICOSTA TECHNOLOGIES LTD», ТОО

050012, г. Алматы, ул. Амангельды, д. 64
Тел. +7 (727) 258 2020
Факс +7 (727) 258 2020, доб. 104
e-mail: info@dicosta.kz
www.dicosta.kz

DICOSTA TECHNOLOGIES LTD – авторизованный дистрибьютор американской компании **Agilent Technologies Inc** по системам химического анализа, обладает более чем 15-летним опытом работы на рынках Республики Казахстан и Кыргызской Республики, является членом Торгово-промышленной палаты США в Республике Казахстан.

Компания **Agilent Technologies Inc** (до 01.11.99 – отдел аналитического оборудования **Hewlett-Packard**) – признанный мировой лидер в разработке и производстве оборудования, систем химического анализа и готовых решений на базе:

- газовой и жидкостной хроматографии (GC, HR-GC, HPLC, UHPLC с самыми разнообразными устройствами детектирования);
- масс-спектрометрии (GC-MS, GC-MS/MS, GC-QTOF LC-MS, LC-MS/MS, LC-TOF/QTOF, MALDI-TOF), в частности, для геномных и протеомных исследований;
- масс-спектрометрии индуктивно-связанной плазмы (ICP-MS) для микроэлементного анализа, в том числе, биологических объектов;
- **капиллярного электрофореза (CE) и сканирующей спектрофотометрии (UV-Vis);**
- сканеров высокого разрешения для биологических микрочипов (Предустановленные методики к ферментам Stratagene);
- биоанализаторов (электрофоретическое разделение, проточно-цитометрический анализ параметров флуоресценции клеток), методики анализа и комплекты реактивов для ДНК, РНК, протеинов и клеток;
- приборов и модулей для ПЦР (PCR, QPCR, PCR Real time).

Компании **Agilent Technologies Inc** и **DICOSTA TECHNOLOGIES LTD** предлагают пользователям автоматизированные технические решения, которые успешно применяются для определения в биологических объектах широкого спектра токсикантов, наркотических и допинговых веществ, контроля безопасности и исследования метаболизма медицинских препаратов, анализа ПЦР и проведения геномных и протеомных исследований.

ТОО «ДЕЛЬРУС РК»

010000, г. Астана, ул. Желтоксан, 38
Тел.: +7 (7172) 31 98 07, 73 81 08, доб.118
Факс +7 (7172) 31 57 21
e-mail: info@delrus-rk.kz, kga@delrus-rk.kz,
www.delrus-rk.kz

ТОО «Дельрус РК» входит в ассоциацию «Дельрус» – крупнейшего поставщика оборудования, расходных материалов для ЛПУ России, Казахстана и стран ближнего зарубежья. Компания «Дельрус РК» была создана в 2008 году и является головным офисом в Республике Казахстан. Региональные представительства расположены в гг.

Павлодар, Алматы, Астана и Актобе. Компания «Дельрус» работает на правах эксклюзивного дистрибьютора ведущих производителей медицинского инновационного оборудования в таких направлениях, как лаборатория – станция преаналитической подготовки образцов, полуавтоматические и автоматические ИФА анализаторы, иммунный блотинг, автоматизированная ПЦР-пробоподготовка, микрочипы, станция по выращиванию клеточных культур (Tecan,GmbH Австрия, Швейцария), Биохимия (AuditDiagnostics, Ирландия), автоматизированная СОЭ-метрия (ALIFAX SPA Италия), Гелевая изосерология (DiaMed AG Швейцария), общелабораторное оборудование (ThermoFisher Германия), ЭКО(MTG Германия), оборудование и расходный материал для стволовых клеток (Biosafe S.A.Швейцария), (CellGenix Германия), (TermogenesisСША), автоматизированное хранилище (Liconic Лихтенштейн), тромбоэластография (Haemoscope США).

Сегодня «Дельрус» гарантирует высокое качество представленного оборудования, полное гарантийное и сервисное обслуживание, обучение персонала и методическую поддержку!

«ИНТЕРМЕДИКА АЛМАТЫ», ТОО

050028 г. Алматы, ул. Земнухова,19а
Тел. +7 (727) 234 24 94
Факс +7 (727) 296 71 82
e-mail: info@intermedica.kz
www.intermedica.kz

Компания ТОО «Интермедика Алматы» представлена на рынке здравоохранения 4 года. Основным видом деятельности компании было и остается обеспечение лечебно-профилактических учреждений изделиями медицинского назначения, лабораторным оборудованием, расходными материалами, ультразвуковым оборудованием.

- Более 50 наименований медицинского и лабораторного оборудования, мебели, инструментария и расходных материалов
- Свыше 5 поставщиков товаров из стран ближнего и дальнего зарубежья
- Более 5000 клиентов во всех регионах республики
- Свыше 10 сотрудников
- Площадь складских помещений 125 кв.м
- Дилерская сеть по всему Казахстану
- Сервисная служба, гарантийное и постгарантийное обслуживание
- Оперативная доставка товаров по Казахстану всеми видами транспорта

«МЕДТЕХНИКА», АО

050050 г. Алматы, ул. Ю.Ратушного, 64а
Тел. +7 (727) 294 28 88
Факс +7 (727) 294 26 66
e-mail: info@medtechnika.kz
www.medtechnika.kz

Компания АО «Медтехника» представлена на рынке здравоохранения свыше 45 лет. Основной вид деятельности – обеспечение лечебно-профилактических учреждений изделиями медицинского назначения, медицинским оборудованием, расходными медицинскими материалами, медикаментами, медицинской мебелью, мягким инвентарем.

- Более 5000 наименований медицинского и лабораторного оборудования, мебели, инструментария и расходных материалов, медикаментов
- Свыше 500 поставщиков товаров из стран ближнего и дальнего зарубежья
- Более 5000 клиентов во всех регионах республики
- Свыше 150 сотрудников
- Площадь складских помещений 7000 кв.м
- Дилерская сеть по всему Казахстану
- Сервисная служба, гарантийное и постгарантийное обслуживание
- Оперативная доставка товаров по Казахстану всеми видами транспорта
- Магазин «Медтехника» и демонстрационный зал

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ ФИРМА «МЕДИЛЭНД», ТОО

050031, г.Алматы, пр. Райымбека/ул. Саина, д. 510-512/2А
Тел.: +7 (727) 238 08 55, 238 08 56, 238 08 57
Факс +7 (727) 238 01 64
e-mail: mail@mediland.kz
www.mediland.kz

ТОО «НПФ Медилэнд» является частной казахстанской компанией с дислокацией в г. Алматы. Компания организована в 1993 году и имеет специализацию в области поставок сложной медицинской и лабораторной техники, а также расходных материалов для приборов клинической и функциональной диагностики, и последующее их сервисное обслуживание. Мы видим своей целью внедрение инновационных технологий в области медицины и исследовательского оборудования, предоставляя в распоряжение наших клиентов последние технические разработки наряду с приборами, уже зарекомендовавшими себя и проверенными обширной практикой пользователей.

Мы имеем постоянно действующий склад расходных материалов и реагентов для предлагаемого нами лабораторного оборудования. С 1996 г. наша компания успешно участвует в тендерах по закупке медицинского, лабораторного оборудования и расходных материалов.

Мы обеспечиваем бесплатное сервисное обслуживание в пределах гарантийного срока и последующее постгарантийное обслуживание на поставленное нами оборудование, обучение специалистов организаций-заказчиков методикам работы на приборах и консультационную поддержку по поставляемому нами оборудованию в различных областях применения. Кроме того, нами создана разветвленная сеть дилеров по всему Казахстану, своевременно реализующих поставляемую нами продукцию.

«ОРДАМЕД КАЗАХСТАН», ТОО

050009 г. Алматы, ул. Ауэзова 14а, 6 этаж
Тел.: +7 (727) 323 66 80
Факс: +7 (727) 323 66 87
e-mail: info@ordamed.kz
www.ordamed.kz

ТОО **«ОрдаМед Казахстан»** входит в холдинг **«ОрдаМед»** – крупнейшего поставщика оборудования и расходных материалов для медицинских учреждений и ла-

бораторий как на территории Казахстан , так и в странах ближнего зарубежья.

Региональные представительства расположены в гг. Алматы, Астана, Актобе, Павлодар, Караганда, Усть-Каменогорск, Семей.

«ОрдаМед Казахстан» является поставщиком лабораторного оборудования и реагентов лабораторного назначения таких крупных производителей, как **Bioneer** (Корея), **DiaSys** (Германия), **DRG** (Германия), **Adaltis** (Италия), **ДНК-технология** (Россия), **J.T.Baker** (Нидерланды), **Helena** (Великобритания), **Socorex** (Швейцария) и многих других.

Объединяя наш ОПЫТ в бизнесе и ОПЫТ врачей, мы достигаем цели – оснащение ЛПУ новыми технологиями.

Наша ОПЕРАТИВНОСТЬ позволяет быстро реагировать на потребности врачей в новом лечебном и техническом оборудовании.

Достигая цели, мы повышаем уровень диагностики и лечения наших граждан.

«ПРОФ МЕДИКАЛ», ТОО

050031 г. Алматы,ул. Толе би, 305, оф. 39
Тел.: +7 (727) 317 19 71, 317 34 23
Факс +7 (727) 238 17 38
e-mail: prof-med@mail.ru
www.prof-med.kz

Компания ТОО «Проф Медикал» предоставляет широкий спектр медицинского оборудования в следующих направлениях медицинской деятельности: лаборатория, хирургия, диагностика, стерилизация, физиотерапия и реабилитация. И является официальным представителем медицинского оборудования на территории РК таких зарекомендовавших себя производителей на мировом рынке, как Heine Optotechnik GmbH & Co.KG (Германия), ООО «Мизма» (Украина), НИЦ «Сканер» (Украина), Nouvage GmbH (Швейцария), ООО «Фотек» (Россия), Mitsubishi Chemical Europe GmbH (Германия), Apel (Япония), Awareness Technology (США), Diatron (Австрия), Techno Medica(Япония), 77 Electronika (Венгрия), MES(Австрия), Meiji Techno (Япония), West Medica (Австрия), Statspin (США), Shin-Nippon(Япония).

«SIEMENS», ТОО

050059 г. Алматы, пр. Достык 117/6, БЦ «Хан-Тенгри»
Тел. +7 (727) 244 99 43
Факс +7 (727) 244 97 48
e-mail: umit.akhmetgaliyev@siemens.com
www.siemens.com

Компания«Siemens» является крупнейшим в мире поставщиком продуктов и услуг в области здравоохранения. **«Siemens»** – единственная в мире компания, охватывающая как in-vitro, так и in-vivo диагностику, терапию и мониторинг различных состояний организма человека.

Сектор здравоохранения компании **«Siemens»** известен своей современной продукцией, высокопрофессиональными услугами и персонализированными, завершенными решениями – от лабораторно-диагностических анализаторов и решений по автоматизации лабораторий до систем по визуализации, терапевтического оборудования, слуховых аппаратов и IT-решений, помогающих оптимизировать рабочие процессы, повысить достоверность диагноза и улучшить качество обслуживания пациентов.

Спектр предложений **«Siemens»** также включает в себя поддержку на всех этапах реализации проектов любой сложности. Компания предоставляет решения для всей сферы медицинского обслуживания – от профилактики и обнаружения заболеваний на ранних стадиях до диагностики, терапии и ухода за пациентами.

Наша миссия: найти ответы на самые трудноразрешимые вопросы, стоящие перед здравоохранением.

«Siemens» – Ваш надежный партнер.

«Siemens» дает ответы на самые актуальные вопросы здравоохранения.

«ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ ЛТД», ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВО КОМПАНИИ В РК

050008, г. Алматы, пр. Абая, 52
Тел. +7 (727) 334 19 45
Факс +7 (727) 334 19 41
e-mail: salim.smailov@roche.com
www.roche.com

Компания Roche Diagnostics («Рош-Диагностика») –мировой лидер в диагностике invitro. Производит диагностическое медицинское оборудование, а также широкий спектр тестов для быстрого и надежного выявления заболеваний и их мониторинга, осуществляемого врачами, лабораториями и самими пациентами.

Широкий спектр инновационных диагностических тестов и систем играет ключевую роль в сфере интегрированных медицинских решений и охватывает раннюю диагностику, скрининг, анализ и мониторинг заболеваний.

«Рош-Диагностика» предлагает оборудование для всех типов лабораторий, включая решения для науки, лабораторий молекулярной диагностики и госпитальных лабораторий, экспресс-диагностики, а также средств самоконтроля сахарного диабета.

«Рош-Диагностика» предлагает не просто свою продукцию, а единую систему, включающую технический сервис, обучение персонала, постоянную методическую поддержку и своевременную доставку реактивов и расходных материалов.

«ЭМКО – ТЕХНОМЕДИКА», ГРУППА КОМПАНИЙ

Россия, 129301, г. Москва, ул. Касаткина, д. 11, стр. 1
Тел. +7 (495) 287 81 00
Факс +7 (495) 287 84 00
e-mail: emco@bk.ru
www.stainer.ru, www.coagulometer.ru

Производство диагностического оборудования для медицинских лабораторий:

- полуавтоматические оптико-механические коагулометры ЭМКО - АПГ2-02 (двухканальные без принтеров), АПГ2-02П (двухканальные со встроенным принтером) и АПГ4-02П (четырехканальные со встроенным принтером)
- наборы реагентов для скрининга системы свертывания крови: МЛТ-Тромбопластин, МЛТ-АЧТВ, МЛТ-Фибриноген, МЛТ-Тромбин, не требующие калибровок на коагулометрах ЭМКО
- автоматы фиксации и окраски мазков АФОМК8-Г-01/АФОМК8-В-01 (с горизонтальным/вертикальным раз-

мещением стекол в штативах), реализующие более 20 методик окраски гематологических, микробиологических, цитологических мазков
- программируемый полуавтоматический биохимический анализатор БиАн (измерения на 6 длинах волн) и биохимические анализаторы на одну длину волны МикроБиАн и Микрола
- гемоглобинометры МиниГЕМ-540, МиниГЕМ-523 (с заводской калибровкой) и МиниГЕМ+ (с возможностью калибровки по стандарту)
- анализатор общего белка в моче Белур 600 (измерения с пирогаллоловым красным, с сульфосалициловой кислотой и др. методами)
- неинвазивные анализаторы гипербилирубинемии у новорожденных Билитест и Билитест 2000
- безреагентный микроанализатор билирубина крови новорожденных Билимет К

«ЮМГИСКОР ХОЛДИНГ», ТОО

010000 г.Астана пр. Сары-Арка, 15, БЦ «Искер», 14 этаж
Тел. +7 (7172) 90 13 89
Факс +7 (7172) 90 12 89
e-mail: info@yumgiskor.kz
www.yumgiskor.kz

Компания «Юмгискор Холдинг» более 5 лет является крупнейшим поставщиком медицинского оборудования на рынке Республики Казахстан. Компания «Юмгискор Холдинг» предлагает медоборудование самого широкого спектра. Имеет дилерскую сеть в 14 городах, сотрудничает с более 40 ведущими производителями медицинской техники США, Дании, Бельгии, Японии и многих других стран. Мы готовы предложить лучшее оборудование таких мировых лидеров, как Olympus Corporation, Radiometer Medical, Aps, Terumo Corporation, Philips Respironics, Beckton Dickinson, Randox, PFM и многих других.

Нас выделяет: индивидуальный подход, сервис, качество, опыт, гибкая ценовая политика.

С самого начала мы поставили себе цель – стать казахстанской компанией мирового класса, стать лидером на своем рынке, и предоставлять сервис на уровне международных компаний.

Выбрав компанию «Юмгискор Холдинг» в качестве своего поставщика медицинского оборудования, Вы получите не только высококачественный сервис, но и заинтересованного и высокопрофессионального партнера, способного помочь нашему здравоохранению стать эффективным, а Вашем пациентам – здоровыми.

MedMedia
KAZAKHSTAN

МедМедиа Казахстан – команда профессионалов.
К нам обращаются ВСЕ, кто хочет получить квалифицированную помощь в развитии медицинского бизнеса.

МТК – единственная газета о медицинских и лабораторных технологиях. МТК – ваш партнер в продвижении медицинского оборудования

периодичность – 1 раз в месяц

- удобный поиск информации по регионам
- уникальная возможность заявить о себе
- гибкая и мощная реклама вашей компании и продукции

периодичность – 1 раз в год

Журнал о здоровье, красоте и хорошем настроении. Будьте с нами! Будьте здоровы!

периодичность – 1 раз в месяц

Журнал о менеджменте в медицине. Его читают организаторы здравоохранения

периодичность – 1 раз в квартал

Профессиональное издание, где публикуются статьи маститых ученых из дальнего и ближнего зарубежья, казахстанских ученых и практических врачей

периодичность – 1 раз в квартал

Журнал именно для тех, кто работает, принимает решения, изучает и анализирует новую информацию в области лабораторной диагностики

периодичность – 1 раз в квартал

ТОО "МедМедиа Казахстан"
Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Дуйсенова, 25
тел.: +7 (727) 330 29 00, e-mail: info@medmedia.kz

www.medmedia.kz

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Весь спектр решений BD
для вашей бактериологической лаборатории

BD

Helping all people live healthy lives

Официальный дистрибьютор Becton Dickinson АО «МЕДТЕХНИКА»

АО «МЕДТЕХНИКА»
Республика Казахстан
050050, Алматы
ул. Ю.Ратушного, 64а

http://www.medtechnika.kz

Направление «Лабораторная диагностика и служба крови»

тел.: +7 (727) 294 22 05
факс: +7 (727) 294 26 66

МЕДТЕХНИКА
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ
алматы

MASIMO

Все как на ладони.

Сеть безопасности пациентов Masimo бережно и внимательно следит за состоянием Ваших пациентов, когда Вы находитесь в другом месте. Точность, надежность и высокая клиническая эффективность Сети позволят избежать ложных тревог и несчастных случаев.

Yumgiskor

Официальный партнер и дистрибьютор Masimo в Казахстане – компания Yumgiskor.

Республика Казахстан, 010000,
г.Астана, ул.Сары-Арка, 15. БЦ «Іскер», 14 этаж.
Тел/факс.: 8 /7172/ 901389, 911389, 901289

050009, г. Алматы, пр.Аль-Фараби 19/1
БЦ "Нурлы Тау", блок 3б, эт.13.
Тел/факс: 8 /727/ 3110133, 3110190

e-mail: info@yumgiskor.kz
www.yumgiskor.kz